การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ และการพัฒนาตำรับเวชสำอางของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

วิทยานิพนธ์

ของ

อรรถพล อุทัยเรือง

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

พฤษภาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ และการพัฒนาตำรับเวชสำอางของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

วิทยานิพนธ์

ของ

อรรถพล อุทัยเรือง

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
พฤษภาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

The Study of Chemical Constituents, Bioactivities and Cosmeceuticals Development of Essential Oil of *Amomum biflorum* Jack

Adthapon Uthairuang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Medicinal Plants and Natural Products)
May 2020
Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายอรรถพล อุทัยเรือง แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. เมธิน ผดุงกิจ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. คัทลียา เมฆจรัสกุล)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์)

....กรรมการ

(ผศ. ดร. วนิดา ไทรชมภู)

....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(ผศ. ดร. นาฏศจี นวลแก้ว)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

....	....
(ผศ. ดร. ชนัตถา พลอยเลื่อมแสง)	(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์	คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

พหูนํ ปณฺฑิโต ชีเว

ชื่อเรื่อง การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ และการพัฒนาตำรับเวชสำอางของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

ผู้วิจัย อรรถพล อุทัยเรือง

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คัทลียา เมฆจรัสกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2563

บทคัดย่อ

ว่านสาวหลงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Amomum biflorum* Jack. เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ทุกส่วนของว่านสาวหลงมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ งานวิจัยส่วนมากทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และยังขาดข้อมูลที่สนับสนุนการเลือกส่วนที่เหมาะสมของพืชเพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้นและส่วนใต้ดิน โดยสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่น ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี–แมสสเปกโทรเมทรี จากนั้นศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีดีพีเอช และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีโดปาโครม และฤทธิ์ต้านเชื้อ *Cutibacterium acnes* ด้วยวิธี Agar diffusion method และ Broth microdilution method จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยส่วนที่มีฤทธิ์ดีมาพัฒนาเป็นตำรับครีม ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้นพบ 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene เป็นองค์ประกอบหลัก น้ำมันหอมระเหยของทั้งสองส่วนมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทรซิเนสไม่แตกต่างกันโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 117.94±19.08 และ 147.03±10.28 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญเติบของเชื้อ *C.acnes* ได้ดีเท่ากันโดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อ *C.acnes* เท่ากับ 75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองส่วนแสดงฤทธิ์ที่ด้อยกว่าสารมาตรฐานแอลฟาโทโคฟีรอล และกรดแอสคอร์บิก จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดินมีศักยภาพสำหรับการพัฒนาเป็นเวชสำอางเพื่อเพิ่มความกระจ่างใสให้แก่ผิว และมีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อสิว เมื่อพิจารณาจากฤทธิ์ทางชีวภาพร่วมกับปริมาณผลผลิตที่กลั่นได้ น้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นได้ปริมาณผลผลิตมากกว่าส่วนใต้ดิน ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันหอมระเหยจากส่วนทั้งต้นมาใช้ในการพัฒนาตำรับครีม พบว่ามี 3 ตำรับที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดี เมื่อศึกษาความคงตัวหลังจากเตรียมตำรับเสร็จ และหลังผ่าน

การทดสอบความคงตัวโดยวิธี Heating-Cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ พบว่าตำรับที่ 1 และ 3 มีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมี โดยค่า pH และ ความหนืดหลังเตรียมเสร็จและหลังการทำ Heating-Cooling cycle ครบ 6 รอบ พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ pH ของตำรับทั้ง 2 ยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือมี pH ใกล้เคียงกับผิวหนัง ซึ่งลดโอกาสที่จะก่อให้เกิดการแพ้ระคายเคืองต่อผิวหนัง จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงมีศักยภาพสำหรับการพัฒนาเป็นเวชสำอางเพื่อเพิ่มความกระจ่างใสให้แก่ผิว และมีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อสิว

คำสำคัญ : ว่านสาวหลง, น้ำมันหอมระเหย, องค์ประกอบทางเคมี, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, ฤทธิ์ต้านเชื้อ Cutibacterium acnes

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

TITLE	The Study of Chemical Constituents, Bioactivities and Cosmeceuticals Development of Essential Oil of *Amomum biflorum* Jack		
AUTHOR	Adthapon Uthairuang		
ADVISORS	Assistant Professor Catheleeya Mekjaruskul , Ph.D. Assistant Professor Ruchilak Rattarom , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Medicinal Plants and Natural Products
UNIVERSITY	Mahasarakham University	YEAR	2020

ABSTRACT

Amomum biflorum Jack. belongs to family Zingiberaceae. Every part has an unique aroma. Pervious studies have mostly focused on biological activity studies of *A. biflorum* extracts by using organic solvents. There is no report to suport which parts of plant are suitable for product development. The aim of this study was to investigate the biological activities and chemical constitutions of *Amomum biflorum* Jack essential oils from whole plant and rhizomes. Essential oils were prepared by water distillation technique. The chemical constitutions were identified by using gas chromatography-mass spectrometry. Antioxidant activities were determined by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and ferric ion reducing antioxidant power assay. Dopachrome method was used for determination of anti-tyrosinase activity. Anti-*Cutibacterium acnes* activity was studied by using agar diffusion method and broth microdilution methods. The product development was then carried out. The results showed that 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene was found as a major constituent in the essential oils both in whole plant and rhizomes. The essential oils from two parts exhibited anti-tyrosinase activities with IC_{50} values of 117.94±19.08 and 147.03±10.28 μg/mL, respectively with no significant difference between two parts. They showed minimum inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration values at 75 μg/mL against *C. acnes*. Antioxidant effects of the

essential oils showed lower potency than those of α-tocopherol and ascorbic acid. Therefore, *A. biflorum* essential oils from whole plant and rhizomes have a potential to develop as the cosmeceutical products for skin whitening and anti-acnes applications. Considering the better biological activity and a high % yields of total volatile oils from whole plant, the essential oil from whole plant was selected for further product development. The developed creams showed a good physical characteristic and stable after heating-cooling stability testing. The pH values were within the normal skin pH range. The viscosity and pH values of the formulations were stable after heating-cooling stability testing (P>0.05). Therefore, *A. biflorum* essential oils from whole plant and rhizomes have a potential to develop as the cosmeceutical products for skin whitening and anti-acnes applications

Keyword : Amomum biflorum Jack, essential oils, chemical constituents, antioxidant, antityrosinase, anti-Cutibacterium acnes

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนอุดหนุนสนับสนุนการวิจัย การสนับสนุนวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คัทลียา เมฆจรัสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ ดูแล และให้คำแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เมธิน ผดุงกิจ ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา ไทรชมภู กรรมการสอบที่ให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของการศึกษาครั้งนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นาฎศจี นวลแก้ว กรรมการสอบ (ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะอาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ที่ให้คำแนะนำและการช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

อรรถพล อุทัยเรือง

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ซ

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพประกอบ ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 สมมติฐานงานวิจัย 3

1.4 กรอบแนวคิด 3

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ 4

1.6 ขอบเขตของการวิจัย 4

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

บทที่ 2 เอกสารที่งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

2.1 ว่านสาวหลง 6

2.2 น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 9

2.3 การศึกษาองค์ประทางเคมีของน้ำหอมระเหยด้วย Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GC-MS) 11

2.4 อนุมูลอิสระ 12

2.5 เม็ดสีผิวและการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส 15

2.6 โรคที่เกิดจากเชื้อ *C. acnes* 17
2.7 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 18
2.8 หลักการเตรียมครีม 20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 25
3.1 รูปแบบการวิจัย 25
3.2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี 25
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย 28
3.3.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (water distillation) 28
3.3.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี 29
3.3.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง 29
3.3.4 การพัฒนาตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง 35
3.4 สถิติที่ใช้ในงานวิจัย 36
บทที่ 4 ผลการวิจัย 38
4.1 การกลั่นน้ำมันหอมระเหย 38
4.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี 38
4.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง 43
4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH 43
4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay 45
4.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีการ dopachrome method 46
4.3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* 48
4.4 การพัฒนาตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง 50
4.4.1. การพัฒนาตำรับครีมว่านสาวหลง 51
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 56
5.1 สรุปผล 56

พหุนปณฺ ฑิโต ชีเว

5.1.1 การกลั่นน้ำมันหอมระเหย 56
5.1.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี 56
5.1.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง 56
5.1.4 การพัฒนาตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง 57
5.2 อภิปรายผลการวิจัย 58
5.3 ข้อเสนอแนะ 62
บรรณานุกรม 63
ภาคผนวก 67
1. การเตรียมสาร 67
2. การทดสอบฤทธิ์เชื้อ *C. acnes* 68
ประวัติผู้เขียน 70

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีและสูตรโครงสร้างของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนต่างๆ... 8

ตาราง 2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ของน้ำมันหอมระเหย 19

ตาราง 3 สารก่ออิมัลชันที่นิยมใช้ในตำรับครีม 21

ตาราง 4 ตัวอย่างการเสื่อมสภาพของยารูปแบบต่างๆ 24

ตาราง 5 ชนิดและปริมาณสารที่ใส่ลงในหลอด A,B,C,D 32

ตาราง 6 การพัฒนาตำรับครีม.. 35

ตาราง 7 ร้อยละของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง (% yield) และลักษณะทางกายภาพของว่านสาวหลงจากส่วนใต้ดิน และส่วนทั้งต้น.. 38

ตาราง 8 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยวิเคราะห์ด้วย GC-MS.................................... 39

ตาราง 9 ความสามารถในต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง 46

ตาราง 10 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง 48

ตาราง 11 แสดงค่า inhibition zone ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC)... 49

ตาราง 12 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 µg/mL 49

ตาราง 13 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 300 µg/mL 50

ตาราง 14 ส่วนประกอบของตำรับที่ 1-3 51

ตาราง 15 แสดงค่า pH และ ความหนืดของตำรับที่ 1-3 หลังจากเตรียมเสร็จใหม่ และหลังการทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Heating-Cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ 52

ตาราง 16 ตารางแสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับหลังเตรียมเสร็จใหม่ (n=3)......................... 54

ตาราง 17 ตารางแสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับหลัง Heating-Cooling cycle รอบที่ 6 54

ตาราง 18 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) tetracycline 68

สารบัญภาพประกอบ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย 3

ภาพประกอบ 2 ว่านสาวหลง 6

ภาพประกอบ 3 กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (DHI คือ 5,6-dihydroxyindole; DHICA คือ 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid ; TRP-1 คือ tyrosinase related protein-1; TRP-2 คือ tyrosinase related protein-2)..................... 16

ภาพประกอบ 4 ว่านสาวหลงส่วนใต้ดิน (ไหล ราก) และส่วนทั้งต้น ของว่านสาวหลง..................... 28

ภาพประกอบ 5 A คือ GC-MS Chromatogram ของน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน B คือ ส่วนขยาย ของ GC-MS Chromatogram ของน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน 41

ภาพประกอบ 6 A คือ GC-MS Chromatogram ของน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น B คือ ภาพส่วนขยายของ GC-MS Chromatogram ของน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น..................... 42

ภาพประกอบ 7 % inhibition of DPPH radical ที่ความเข้มข้นต่างๆของน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน (●) และส่วนทั้งต้น (▲) (n = 3)..................... 44

ภาพประกอบ 8 % inhibition of DPPH radical ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน (Ascorbic acid (✕) และ α-tocopherol (◆) (n = 3)..................... 44

ภาพประกอบ 9 กราฟมาตรฐานสารละลาย $FeSO_4$ (n = 3)..................... 45

ภาพประกอบ 10% tyrosinase inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน (●) และส่วนทั้งต้น (▲) (n = 3) (n=3)..................... 47

ภาพประกอบ 11 % tyrosinase inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของ Kojic acid (n=3)..................... 47

ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงค่า pH ของตำรับที่ 1, 2 และ 3 ที่ทดสอบความคงตัวด้วย Heating-Cooling Cycle (n=3)..................... 53

ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงค่าความหนืด ของตำรับที่ 1, 2 และ 3 ที่ทดสอบความคงตัวด้วย Heating-Cooling Cycle (n=3)..................... 53

ภาพประกอบ 14 ลักษณะทางกายภาพของตำรับหลัง Heating-Cooling cycle รอบที่ 6..................... 55

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ประเทศไทยมีการนำพืชสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่สมัยอดีตจนถึงปัจจุบัน และในปัจจุบันได้รับความนิยมนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ เช่น ยารักษาโรค ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเวชสำอาง และเครื่องสำอาง เป็นต้น พฤติกรรมของผู้บริโภคมีการหันมาใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติมากขึ้นเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ดังนั้นการวิจัยและพัฒนานวัตกรรมด้านผลิตภัณฑ์สมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์เวชสำอางจากสมุนไพรไทยให้มีคุณภาพมาตรฐาน และความปลอดภัยจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง รวมถึงการสนับสนุนของรัฐบาลโดยกำหนดแผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564 ที่มีเป้าหมายส่งเสริมผลิตผลของสมุนไพรที่มีศักยภาพ พัฒนาอุตสาหกรรมและตลาดสมุนไพรให้มีคุณภาพระดับสากล สนับสนุนการใช้สมุนไพรเพื่อการรักษาโรคและการส่งเสริมสุขภาพอย่างยั่งยืน (กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2551) อย่างไรก็ตามยังมีสมุนไพรอีกจำนวนมากที่ยังขาดข้อมูลด้านวิทยาศาสตร์ รวมถึงว่านสาวหลง (*Amomum biflorum* Jack.) ที่เป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่มีการใช้มาตั้งแต่อดีต แต่ยังขาดข้อมูลการวิจัยด้านฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

ว่านสาวหลงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Amomum biflorum* Jack. เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae อยู่ในตระกูล Amomum ตระกูลเดียวกันกับกระวานและเร่ว ทุกส่วนของว่านสาวหลงมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ ภูมิปัญญาพื้นบ้านนำเหง้ามาต้มน้ำดื่มเพื่อขับลมในทางเดินอาหารหรือต้มอาบเพื่อบำรุงผิวพรรณ รักษาโรคผิวหนัง หรือดอกสดนำมาสูดดมแก้อาการวิงเวียนศีรษะ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550) นอกจากนี้มีความเชื่อว่าว่านสาวหลงเป็นว่านเมตตามหานิยม ปลูกในบ้านเรือนจะเป็นสิริมงคลแก่สถานที่ โบราณเชื่อว่าการนำส่วนเหง้าถือติดตัวไปคนที่ได้พบเจอก็จะหลงรักใคร่ ว่านสาวหลงมีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักคือน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ camphor, α-bisabolol, camphene และ α-humulene (Singtothong et al, 2013) ว่านสาวหลงมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารสกัดส่วนเอทิลอะซิเตตจากเหง้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดเฮกเซนจากเหง้า และสารสกัดเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และสารสกัดเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ยับยั้ง nitric oxide (Charoensuk, 2013)

ว่านสาวหลงส่วนเหง้าเป็นส่วนของพืชที่ถูกนำมาใช้ตามการใช้ของโบราณและภูมิปัญญาพื้นบ้าน (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550) แต่ที่พบในปัจจุบันนั้นการนำว่านสาวหลงมาใช้ประโยชน์ในด้าน

สุขภาพและเวชสำอาง เช่น สบู่ โลชั่น และผลิตภัณฑ์ในธุรกิจสปา ใช้ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากส่วนทั้งต้น ซึ่งในร้านขายเครื่องยาสมุนไพรในประเทศไทยจะจำหน่ายว่านสาวหลงทั้งต้นซึ่งรวมทั้งส่วนเหนือดินและใต้ดินในรูปแบบที่บดเป็นผงแห้ง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านสาวหลงพบรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยพบว่าสารสกัดส่วนเอทิลอะซิเตตจากเหง้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดเฮกเซนจากเหง้า และสารสกัดเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และสารสกัดเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ยับยั้ง nitric oxide (Charoensuk, 2013) ส่วนน้ำมันหอมระเหยมีรายงานฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านสาวหลงยังมีค่อนข้างน้อย และยังขาดข้อมูลที่สนับสนุนการเลือกส่วนที่เหมาะสมของพืชเพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับการพัฒนาเป็นเวชสำอาง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุต่อการเกิดสิว ของน้ำมันหอมระเหยจากว่านสาวหลง โดยเปรียบเทียบน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้นซึ่งเป็นส่วนที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในรูปแบบผงโดยนำทั้งต้นมาบดเป็นผง และส่วนใต้ดินของว่านสาวหลงซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ตามการใช้ของโบราณและภูมิปัญญาพื้นบ้าน และเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากทั้งสองส่วน เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ว่านสาวหลงสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง จากนั้นเลือกน้ำมันหอมระเหยของว่านสาวหลงจากส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุดมาพัฒนาเป็นเวชสำอางต้นแบบสำหรับใช้ภายนอกในรูปแบบครีมว่านสาวหลงที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ ส่งเสริมการใช้สมุนไพร รวมถึงลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มมูลค่าให้แก่สมุนไพรไทย นอกจากนี้สามารถต่อยอดองค์ความรู้ นำนวัตกรรมสมุนไพรไทยจากผลงานวิจัยไปเพิ่มศักยภาพแก่ผู้ประกอบการ ส่งผลให้ผู้บริโภคสามารถเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพรไทยที่ผ่านระบบการวิจัยสมัยใหม่ตามมาตรฐานสากลได้อย่างมั่นใจ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 จุดประสงค์ทั่วไป

เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ และพัฒนาตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

1.2.2 จุดประสงค์เฉพาะ

1.2.2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดิน ด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS)

1.2.2.2 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดิน

1.2.2.3 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดิน

1.2.2.4 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Cutibacterium acnes* ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดิน

1.2.2.5 เพื่อพัฒนาตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุดให้มีความคงตัว

1.3 สมมติฐานงานวิจัย

1.3.1 น้ำมันหอมระเหยจากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดินของว่านสาวหลงมีองค์ประทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่แตกต่างกัน

1.3.2 น้ำมันหอมระเหยจากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดินของว่านสาวหลงมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน

1.3.3 ตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงมีความคงตัวทางกายภาพ

1.4 กรอบแนวคิด

กรอบแนวคิดงานวิจัยแสดงในภาพประกอบ 1

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.5.1 ว่านสาวหลง หมายถึง พืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Amomum biflorum* Jack. ที่เก็บจากตำบลเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา

1.5.2 ส่วนทั้งต้น หมายถึง ลำต้นเทียม ใบ ไหล และรากของว่านสาวหลง

1.5.3 ส่วนใต้ดิน หมายถึง ส่วนที่อยู่ใต้ดินของว่านสาวหลง ได้แก่ ไหลและราก

1.5.4 น้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง หมายถึง การนำผงแห้งสมุนไพรแห้งว่านสาวหลงมากลั่นด้วยชุดเครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหย

1.5.5 ตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง หมายถึง การนำว่านสาวหลงจากส่วนของพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุด มาพัฒนาเป็นตำรับครีมที่มีวัฏภาคน้ำ วัฏภาคน้ำมัน และผสานเข้ากันด้วยอิมัลซิฟายเออร์

1.5.6 Heating-Cooling cycle หมายถึงสภาวะที่ใช้ในการทดสอบความคงตัวของตำรับครีม โดยนำครีมเก็บที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตำรับเข้าเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำทั้งหมด 6 รอบ โดยทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพก่อนและหลังการทดสอบครบ 6 รอบ

1.5.7 ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ หมายถึง การสังเกตลักษณะภายนอกของตำรับครีม ได้แก่ สี กลิ่น ลักษณะของเนื้อครีม (ความเนียนและการแยกชั้นของตำรับ) ความเกาะติดผิวและการแพร่กระจายบนผิวหลังจากทาครีม และความหนืดที่วัดโดยเครื่อง Brookfield meter

1.6 ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างต้นว่านสาวหลงที่มีอายุ 2 ปีขึ้นไป ช่วงเวลาการเก็บตั้งแต่เดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมากพระราชดำริ ตำบลเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย และศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* จากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดินของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง (*A. biflorum* Jack.) และพัฒนาเป็นตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง ทำในห้องปฏิบัติการวิจัยที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 ได้ข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง และฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง เพื่อสนับสนุนต่อการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและเป็นแนวทางในการคัดเลือกรูปแบบผลิตภัณฑ์ต่อไป

1.7.2 ได้ตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงที่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและมีความคงตัว

1.7.3 ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของงานวิจัยนี้ไปใช้ในการสนับสนุนการเลือกใช้ส่วนของต้นว่านสาวหลงในการนำไปใช้ด้านต่างๆ ต่อไป

1.7.4 ทำให้เกิดความเชื่อมั่นจากผู้บริโภคหรือผู้ใช้ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสมุนไพรว่านสาวหลง

พหูน ปญฺญา ฒิโต ชีเว

บทที่ 2
เอกสารที่งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ว่านสาวหลง

ว่านสาวหลงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amomum biflorum* Jack จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อพ้องว่า *Amomum elelttarioides* Baker, *Cardamomum biflorum* (Jack) Kuntze, *Cyphostigma pubescens* (Ridl.) K. Schum, และ *Elettariopsis pubescens* Ridl. (The Plant List, 2013) มีชื่อพื้นเมือง (จังหวัดสงขลา ประเทศไทย) คือ Put nu, Wan sao long (GBG No.93467) (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2559) ตระกูลเดียวกันกับเร่วและกระวาน เป็นพืชล้มลุก มีไหลใต้ดิน (Rhizome) กาบหุ้มใบแดงซ้อนคล้ายเป็นลำต้น (Pseudostems) สูง 30-80 เซนติเมตร ใบเดี่ยวสลับยาว 30-45 เซนติเมตร แผ่นใบมีขนทั้งสองด้านของใบ ช่อดอกเกิดที่เหง้าชูขึ้นเหนือพื้นดินห่างจากโคนลำต้นเทียม กลีบดอกและกลีบเลี้ยงมีสีขาว ตรงกลางดอกมีแถบสีเหลือง ผลกลมสีเขียวแกมเหลืองมีหนาวสีแดงปกคลุมทั่วผล ดังแสดงในภาพประกอบ 2 ทุกส่วนของว่านสาวหลงมีกลิ่นหอม (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2559)

ภาพประกอบ 2 ว่านสาวหลง (ที่มา: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (2553), องค์การสวนพฤกษศาสตร์ (2559))

2.1.1 การใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์พื้นบ้าน

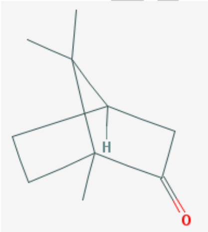
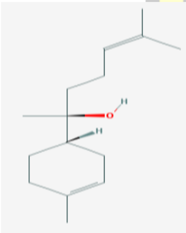
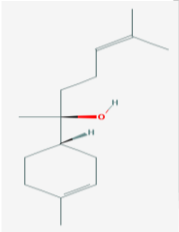
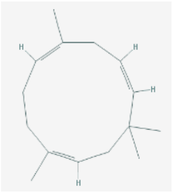
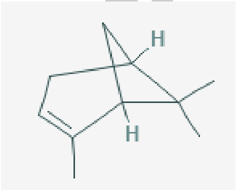
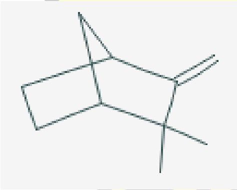
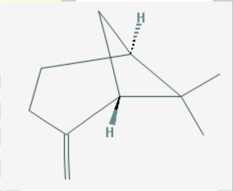
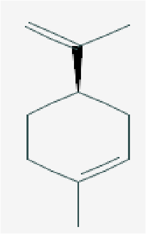
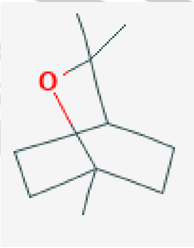
ว่านสาวหลงเป็นพืชพื้นบ้านมีการใช้ประโยชน์มาอย่างยาวนาน ในตำราโบราณระบุว่า ว่านสาวหลงเป็นว่านทรงคุณค่าทางเมตตามหาเสน่ห์ นิยมปลูกไว้ในบ้านจะเป็นสิริมงคล หากนำเหง้ามาฝนหรือผสมกับสีผึ้ง หรือนำน้ำมันมาทาตัว หรือนำเหง้าแห้งติดตัวจะเพิ่มเสน่ห์ให้ผู้อื่นหลงใหลรักใคร่ นอกจากนั้นยังเป็นส่วนผสมของน้ำยาว่าน 108 ภูมิปัญญาท้องถิ่นจึงนำว่านสาวหลงมาใช้เป็น

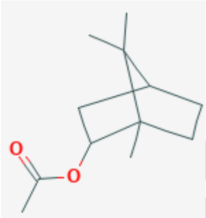
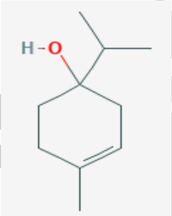
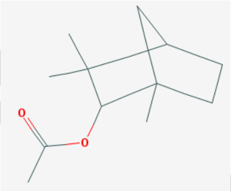
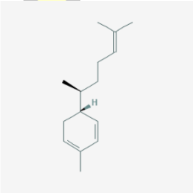
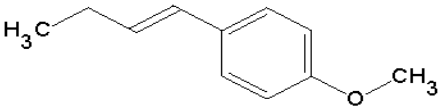
สมุนไพรด้านความสวยงาม โดยการนำทุกส่วนของว่านสาวหลงมาต้มอาบเพื่อบำรุงผิวพรรณ หรือนำมาต้มดื่มเพื่อขับลมในทางเดินอาหาร ปัจจุบันมีการนำว่านสาวหลงมาพัฒนาวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยเพื่อใช้เป็นสารสำคัญในเครื่องสำอางอื่นๆ เช่น สบู่ โลชัน และแชมพู รวมถึงในธุรกิจสปา เป็นต้น (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550)

2.1.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมี

การศึกษาทางวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันของว่านสาวหลงมีข้อมูลรายงานค่อนข้างน้อย ข้อมูลรายงานด้านเคมี ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และความปลอดภัยยังมีไม่มากนัก จากการศึกษาสารสกัดส่วนน้ำได้น้ำหนักสารสกัดสูงสุดเท่ากับร้อยละ 5.72 ของน้ำหนักแห้ง รองลงมาสารสกัดส่วนเอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ตามลำดับ และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากเหง้าว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะได้ดี และสารสกัดเฮกเซนจากเหง้าว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเมทานอลและเอธิลอะซิเตตจากใบว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน สารสกัดส่วนเมทานอลจากใบว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้ง nitric oxide (กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2553) น้ำมันหอมระเหยจากต้นสดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (MIC : 30 mmole Trolox/mg) (Singtothong et al, 2013) และเมื่อนำสารสกัดส่วนเมทานอลจากใบว่านสาวหลงมาแยกองค์ประกอบทางเคมีพบว่ามีสาร 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene เป็นสารสำคัญและออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Charoensuk, 2013) และมีรายงานฤทธิ์ขับปัสสาวะของน้ำมันหอมระเหย (Minh, et al, 2009) จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี พบสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงในส่วนทั้งต้น ได้แก่ camphor (17.6%), α-bisabolol (16.0%), camphene (8.2%) and α-humulene (5.1%) ตามลำดับ ในส่วนใต้ดินพบ camphor (4.98%), β-pinene (3.48%) , 1,8-cineole (3.43%) และ Limonene (3.25%) ตามลำดับ และส่วนเหนือดินพบสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ camphor (3.65%), Limonene (3.44%) และβ-pinene (3.34%) ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบสาร 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene ที่สกัดด้วยวิธี steam distillation จากส่วนใบลำต้นและไหล วิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค high resolution GC, GC/MS, IR และ NMR spectronietiy พบสารดังกล่าว 91.2%, 94.7% และ 90% ตามลำดับ (Dung, *et al*. 2015) และสูตรโครงสร้างดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีและสูตรโครงสร้างของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนต่างๆ (ที่มา: Charoensuk, 2013; National Center for Biotechnology Information, n.d.; Minh, *et al.*, 2009; Singtothong et al., 2013; สนั่น ศุภธีรสกุล และกชกร มุสิกพงษ์, 2557; Dung, *et al,* 2015)

น้ำมันหอมระเหยของว่านสาวหลงทั้งต้นสด			
 Camphor $(C_{10}H_{16}O)$	 α-bisabolol $(C_{15}H_{26}O)$	 Camphene $(C_{6}H_{16})$	 α-Humulene $(C_{15}H_{24})$
น้ำมันหอมระเหยที่พบในส่วนใต้ดินและส่วนเหนือดิน			
 α-pinene $(C_{10}H_{16})$	 Camphene $(C_{6}H_{16})$	 β-pinene $(C_{10}H_{16})$	 Limonene $(C_{10}H_{16})$
 1,8-Cineole $(C_{10}H_{18}O)$		Camphor $(C_{10}H_{16}O)$	

<table>
<tr><td colspan="4">น้ำมันหอมระเหยที่พบเฉพาะในส่วนใต้ดิน</td></tr>
<tr><td>
bornyl acetate
($C_{12}H_{20}O_2$)</td><td>
4-terpineol
($C_{10}H_{18}O$)</td><td>
fenchyl acetate
$C_{12}H_{12}O_2$</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">น้ำมันหอมระเหยที่พบเฉพาะในส่วนเหนือดิน</td></tr>
<tr><td colspan="4">
2,4-diisopropenyl-1-metyl-1 -vinyl-cyclohexane
($C_{15}H_{24}$)</td></tr>
<tr><td colspan="4">น้ำมันหอมระเหยส่วนใบ ส่วนลำต้น และส่วนราก</td></tr>
<tr><td colspan="4">
1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene
($C_{11}H_{14}O$)</td></tr>
</table>

2.2 น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร ตามคำจำกัดความของ ISO ในเอกสาร Aromatic natural raw materials Vocabulary (ISO 9235:2013) ให้คำจำกัดความของน้ำมันหอมระเหยหรือภาษาอังกฤษคือ essential oil ไว้คือ น้ำมันหอมระเหยเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแหล่งวัตถุดิบธรรมชาติโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (water distillation) กลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) หรือการกลั่นแห้ง (dry distillation) แล้วแยกออกจากส่วนที่เป็นน้ำมันออกจากน้ำ (International Organization for Standardization, 1997) น้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่มีองค์ประกอบซับซ้อน ได้จากการสกัดจากส่วน

ของพืชที่เก็บไว้ในส่วนต่างๆ เช่น เมล็ด ดอก ใบ ผล เปลือก หรือแม้กระทั่งที่รากและเหง้าใต้ดิน มีลักษณะเป็นของเหลวใส ระเหยได้ง่ายแม้ในอุณหภูมิห้อง มีกลิ่นหอมเฉพาะตัวและมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยในพืชสมุนไพรแต่ละชนิด (สิริลักษณ์ มายานิม, 2545) ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบประเภท terpenes ที่มีสูตรโครงสร้างทั่วไปคือ $(C_5H_8)n$ นอกจากนี้ยังพบสารประกอบประเภท phenylpropenes ที่มีโครงสร้างหลักเป็นวงอะโรมาติก (aromatic ring) พืชที่ให้น้ำมันหอมระเหยที่สำคัญได้แก่ พืชที่อยู่ในวงศ์ Labiatae, Rutaceae, Zingiberaceae และGramineae (ปวีณ์นุช ถือแก้ว, 2560) การใช้ประโยชน์น้ำมันหอมระเหย มีการใช้เพื่อการบำบัดรักษาโรคหรือที่เรียกว่า สุคนธบำบัด (aromatherapy) ใช้ในกลุ่มคนที่ต้องการผ่อนคลายความเครียด กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยจะกระตุ้นสมองส่วนที่มีผลต่ออารมณ์ มีรายงานการศึกษาผลต่อการผ่อนคลายของน้ำมันหอมระเหยจากว่านสาวหลงในอาสาสมัครจำนวน 120 คน โดยนำน้ำมันหอมระเหยจำนวน 4 หยดลงบนสำลีแล้วสูดดมโดยตรง วัดผลโดยการวัดอัตราการเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจก่อนและหลังการทดลอง พบว่ามีผลต่อการผ่อนคลาย (สนั่น ศุภธีรสกุล และกชกร มุสิกพงษ์, 2557) หรือการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้บรรเทาอาการเจ็บป่วย เช่น การพัฒนาครีมจากน้ำมันหอมระเหยจากขิงเป็นครีมนวดเท้าเพื่อบรรเทาอาการชาและปวดในผู้ป่วยโรคเส้นประสาทจากเบาหวานพบว่า ครีมนวดจากน้ำมันหอมระเหยขิงสามารถลดอาการชาและปวดที่เท้าในผู้ป่วยโรคเส้นประสาทจากเบาหวานได้คิดเป็น 34.48% (กมลชนก อบอุ่น และปิลันธนา เลิศสถิตธนกร, 2554) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ประภัสสร วีระพันธ์ และวัชรี คุณกิตติ, 2554) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งลดการสร้างเม็ดสีผิวได้ (Matsuura et al., 2006) หรือฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* (Norajit et al, 2007; วันวิสาข์ คุณะวัฒนกุล และคณะ, 2560)

2.2.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหย สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

2.2.1.1 Solvent extraction เป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น เฮกเซน ไซโคลเฮกเซน

2.2.1.2 Resorption เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการดูดซับ ส่วนใหญ่ใช้วิธีนี้กับการสกัดกลีบดอก สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ Enfleurage เป็นการวางกลีบดอกไม้ลงบนขี้ผึ้งที่เคลือบบนแก้ว แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิเยือกแข็ง น้ำมันหอมระเหยจะถูกดูดซับด้วยขี้ผึ้ง แล้วจึงสกัดน้ำมันออกโดยใช้ตัวละลายที่ไม่มีขั้ว หรือวิธีที่นำกลีบดอกไปต้มกับไขมันด้วยอุณหภูมิต่ำ แล้วนำไขมันไปสกัดเอาน้ำมันหอมระเหย

2.2.1.3 Mechanical Expression เป็นการสกัดโดยวิธีการบีบ จะได้น้ำมันที่ผสมอยู่กับน้ำ นำไปแยกโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง

2.2.1.4 Steam Distillation เป็นการกลั่นโดยใช้ไอน้ำผ่านสมุนไพร โดยไอน้ำจะสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยลอยขึ้นและควบแน่นเป็นหยดน้ำโดย condenser

2.2.1.5 Water Distillation เป็นการสกัดโดยนำสมุนไพรไปต้มกับน้ำ แล้วระเหยกลายเป็นไอขึ้นไปควบแน่นบริเวณที่มี condenser แล้วกลั่นตัวมาเป็นของเหลว จากนั้นเก็บส่วนที่เป็นน้ำมัน แต่วิธีนี้จะทำให้น้ำมันที่มีองค์ประกอบของสารประเภทเอสเทอร์ถูกตัดขาด

2.2.1.6 Supercritical Fluid extraction เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหย ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2554)

2.3 การศึกษาองค์ประทางเคมีของน้ำหอมระเหยด้วย Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GC-MS)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย นิยมใช้วิธี GC-MS ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ GC เป็นโครมาโตกราฟฟี่ชนิดแก๊ส ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง และ MS ทำหน้าที่พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่เป็นองค์ประกอบที่ออกมาจากเครื่อง GC สารประกอบที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS ต้องเป็นสารที่ระเหย มีมวลโมเลกุลไม่เกิน 700 amu สามารถวิเคราะห์ได้หลายประเภท ได้แก่ การสร้างกราฟระหว่างปริมาณของมวลทั้งหมดกับเวลา เรียกว่า Total Ion Chromatogram (TIC) ความสามารถในวิเคราะห์อยู่ที่ 1-10 นาโนกรัม หรือการนับเฉพาะไอออนที่มีเลขมวลต่อประจุค่าหนึ่งๆ เรียกว่า selective Ion Monstering (SIM) ความสามารถในวิเคราะห์อยู่ที่ 1-10 พิโคกรัม ข้อมูลที่ได้จาก SIM สามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ หาสูตรโครงสร้าง และมวลโมเลกุลได้ และ การวิเคราะห์แบบข้อมูลคงที่ (Retention time) ข้อมูลนี้สามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ประกอบสเปกตรัมมวลได้ (อรอุมา ภู่ประเสริฐ และมาลัย สถิรพันธุ์, 2549)

2.3.1 องค์ประกอบของเครื่อง GC-MS

2.3.1.1 GC แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ (1) Injection (ประกอบด้วย Split, Splitless, On column) เป็นส่วนที่สารตัวอย่างถูกฉีดเข้าเครื่องและระเหยกลายเป็นไอ บริเวณนี้อุณหภูมิต้องสูงพอที่สามารถทำให้สารตัวอย่างระเหยเป็นไอ แต่ไม่สูงเกินไปจนทำให้สลายสารตัวอย่างสลายตัว ถ้าการวิเคราะห์โดยใช้ packed column จะใช้อัตราการไหลของของก๊าซตัวพา ประมาณ 20 มิลลิเมตรต่อนาที โมเลกุลตัวอย่างที่หนักกว่าก๊าซตัวพา จะถูกฉีดออกมาทางหัวฉีดและผ่านเข้าสู่ช่องแคบ (2) Oven เป็นส่วนที่ใช้สำหรับบรรจุคอลัมน์ และเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ โดยการควบคุม

อุณหภูมิมี 2 ลักษณะคือ Isocratic temperature และ Gradient temperature (3) Detector คือส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดองค์ประกอบที่อยู่ในสารตัวอย่าง

2.3.1.2 MS เป็นเครื่องมือวิเคราะห์โมเลกุลขององค์ประกอบถูกแยกเป็นไอออนโดยเครื่อง GC ตรวจวัดออกมาเป็นเลขมวล (Mass Number) เทียบกับฐานข้อมูลอ้างอิงแล้วแปลผลออกมาเป็นชื่อขององค์ประกอบนั้น องค์ประกอบของ MS แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ (1) แหล่งกำเนิดไอออน (Ionization Source) นิยมใช้สองแบบคือ Electron Impact โดยสารตัวอย่างชนกับอิเล็กตรอน ทำให้โมเลกุลแตกเป็นไอออนจำนวนมาก สามารถสืบค้นในฐานข้อมูลและนำไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และโครงสร้างของสาร และแหล่งกำเนิดไอออนแบบ Chemical Ionization โดยสารตัวเข้าปฏิกิริยากับไอออนของแก๊สรีเอเจนต์ โมเลกุลสารตัวอย่างแตกไอออนแล้วผ่านเข้าไปในIonization chamber นิยมใช้สำหรับการหามวลโมเลกุล (2) Mass Analyzer เป็นเครื่องมือวิเคราะห์มวล โดยใช้หลักการวิเคราะห์ด้วยสนามแม่เหล็ก เป็น Path-stability mass spectrometer โดยทำงานแยกเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอ และส่วนที่สองทำให้สารมาตรฐานกลายเป็นไอ ทั้งสองส่วนจะถูกให้ผ่านเครื่องแยกไอออนชุดเดียวกัน และวัดด้วยเครื่อง Detector แยกกัน (โลมไสล วงศ์จันตา และคณะ, 2556; อรอุมา ภู่ประเสริฐ และมาลัย สถิรพันธุ์, 2549)

2.4 อนุมูลอิสระ

2.4.1 อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอน อนุมูลอิสระนั้นไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ และจะจับกับโมเลกุลข้างเคียงต่อไปเรื่อยๆ เรียก เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) และเกิดขึ้นตลอดเวลาดังสมการ 1 และ 2

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \qquad \text{สมการ 1}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \qquad \text{สมการ 2}$$

อนุมูลอิสระเป็นเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นในร่างกายเป็นปกติ และร่างกายจะมีการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ออกไปผ่านทางเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ เมื่อการไม่สมดุลกันระหว่างการเกิดและการต้านอนุมูลอิสระจึงส่งผลเสียต่อระบบภายในของร่างกาย ระดับความเป็นพิษของอนุมูลอิสระสามารถบอกได้จากความสามารถในการออกซิไดซ์ สารชีวโมเลกุลในร่างกาย สารอนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ oxygen radical, อนุพันธ์ของ oxygen radical (เช่น superoxide radical และ hydroxyl radical), hydrogen peroxide, โลหะทรานซิชัน ,

carbonate radical ($CO_3^{\bullet-}$), nitrate radical ($NO_3^{\bullet}$), methyl radical ($CH_3^{\bullet}$), superoxide radical ($O_2^{\bullet}$), peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$) และreactive oxygen species (ROS) เป็นต้น สารอนุมูลอิสระเกิดจากการเผาผลาญอาหาร สารต่างๆ กระบวนการสร้างพลังงาน การหายใจระดับเซลล์ รวมถึงกลไกการปกป้องตัวเองของร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมภายนอกต่างๆ หากร่างกายมีกระบวนดังกล่าวที่มากเกินไปหรือความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอจะเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระภายในร่างกายและเกิดภาวะที่เรียก oxidative stress ซึ่งถ้าเกิดภาวะดังกล่าวเป็นเวลานานจะส่งผลให้มีการสารชีวโมเลกุล เช่น ไขมัน โปรตีน เอนไซม์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ คาร์โบไฮเดรต เซลล์เมมเบรน คอลลาเจน ไมโตคอนเดีย และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จนนำไปสู่การเสื่อมของอวัยวะและเกิดโรคในหลายระบบ เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด หรือโรคทางสมองและระบบประสาท มะเร็ง หรือแม้กระทั่งระบบผิวหนัง นอกจากนั้นอนุมูลอิสระยังสามารถเกิดจากปัจจัยภายนอกของร่างกายได้ เช่น การได้รับเชื้อโรค รังสีเอ็กซ์ รังสีอัลตราไวโอเลต มลภาวะต่างๆ เช่น ควันบุหรี่ ควันท่อไอเสีย ควันเผาไหม้ต่างๆ รวมถึงการใช้ยาบางชนิดเช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนนิซิลลามิน (penicillamine) และพาราเซตามอล (paracetamol)

2.4.2 สารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ คือสารที่สามารถป้องกันหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ร่างกายจะมีการสร้างสารต้านอออกซิเดชัน เอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านออกซิเดชันเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ เสริมฤทธิ์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการ 3 และ 4

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet} \qquad \text{สมการ 3}$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet} \qquad \text{สมการ 4}$$

โดย R• และ RO• คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

2.4.2.1 สารต้านออกซิเดชันมีแหล่งที่ 2 แหล่ง ได้แก่

1) สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) เป็นสารต้านออกซิเดชันที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ propyl gallate, 2 -butylated hydroxyanisole, 3 -butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone ซึ่งสารต้านออกซิเดชันชนิดสังเคราะห์จะมีความคงตัวว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ นิยมนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ป้องกันอาหารเปลี่ยนกลิ่น เปลี่ยนสี หรือเปลี่ยนรสชาติ

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีวา

2) สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ (natural antioxidants) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่น ๆ เช่น vitamin E vitamin C glutathione สารในกลุ่มฟลาร์โวนอยด์ สารกลุ่มคาโรทีนอยด์ และสารกลุ่มฟีนอลิก โดยลักษณะสำคัญของสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเหล่านี้ที่มีร่วมกันก็คือ การมี conjugated double bond อยู่ในโครงสร้าง เพราะเมื่อสารเหล่านี้รับหรือสูญเสียอิเล็กตรอนไป อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะย้ายตำแหน่งภายในโครงสร้างได้และทำให้โมเลกุลมีความเสถียรกว่าสารที่ไม่มี conjugated double bond ดังนั้นความรุนแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมาใหม่ก็จะลดลง ส่วนสารต้านออกซิเดชันที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ glutathione peroxidase, glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxid dismutase สามารถเปลี่ยน $O_2^{\bullet-}$ เป็น H_2O_2

2.4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน

2.4.3.1 การตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน เป็นการทดสอบหาชนิดของสารต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่างโดยอาศัยการเกิดสี การตกตะกอน ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย หรือการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ เช่น shonida test และ pew test (ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดสารกลุ่มโพลิฟีนอล) หรือวิธี thin layer chromatography (TLC) เป็นการแยกสารและวิเคราะห์สารกลุ่มโพลิฟีนอล อาจมองเห็นได้ด้วยตามเปล่าหรือต้องทำปฏิกิริยา spray reagent หรือส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) รวมถึงการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี high performance liquid chromatography, HPLC โดยผลที่ได้จะแสดงในรูปแบบของโครมาโตแกรม ทั้งนี้ต้องมีสารมาตรฐานใช้ในการเปรียบเทียบโดยสารชนิดเดียวกันแสดงพีคออกมาในระยะเวลา (retention time) เดียวกันเสมอ

2.4.3.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านออกซิเดชัน วิธีที่นิยมได้แก่ การฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH โดยวัดจากค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็น 50% of inhibitory concentration (IC_{50}) การทดสอบด้วยวิธี ($ABTS^{\bullet+}$,2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นทดสอบความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ และวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ferric ion reducing antioxidant power (FRAP assay) เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก โดยอาศัยหลักการของสารต้านออกซิเดชันถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)\ (TPTZ)_2]^{3+}$ เปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(III)\ (TPTZ)_2]^{2+}$ โดยสารประกอบเชิงซ้อนที่เปลี่ยนไปสามารถคำนวณหาค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้จาก FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์

รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) โดยวิธีการของ DPPH และ $ABTS^{\bullet+}$ เป็นความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระโดยดูการลดลงของอนุมูลอิสระ (บุหรัน พันธ์สวรรค์, 2556)

2.5 เม็ดสีผิวและการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

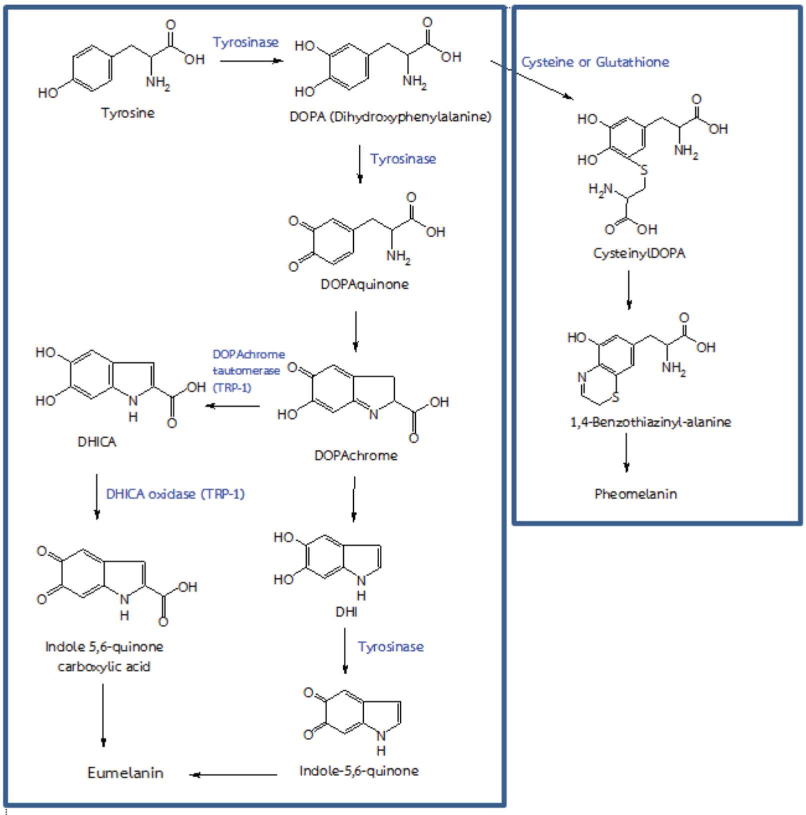
2.5.1 เม็ดสีผิว (Melanin)

เมลานินหรือเม็ดสี สร้างจากเซลล์ผิวหนังที่เรียกว่าเมลาโนไซต์ (Melanocyte) พบอยู่ที่ผิวหนังในชั้น epidermis ใน hair follicle และใน dermis โดยแทรกอยู่ระหว่าง basal cell โดยเมลาโนไซต์จะสร้างสารเมลานินบรรจุในแกรนูลเรียกว่าเมลาโนโซม (melanosomes) ที่อยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์ ขบวนการสร้างเมลานินต้องอาศัยเอนไซม์ไทโรซิเนส ถ้าขาดเอนไซม์ชนิดนี้จะไม่สามารถสร้างเมลานินได้ เมื่อสร้างเสร็จจะถูกส่งออกจากเมลาโนไซต์ เข้าไปอยู่ใน keratinocyte เมลานินสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดได้แก่ ยูเมลานิน (Eumelanin) เป็นเซลล์เม็ดสีเข้ม เพราะมีเมลานินบรรจุอยู่ในแกรนูลเมลาโนโซมมาก และฟีโอเมลานิน (Pheomelanin) เป็นเซลล์สีเหลืองหรือแดง เพราะมีเมลานินน้อย หน้าที่ของเมลานินมีหลายประการได้แก่ ทำหน้าที่กรองแสงและดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลต

2.5.2 ชีวสังเคราะห์เมลานิน

กระบวนการสังเคราะห์เมลานิน โดยเมลาโนไซต์จะทำหน้าที่สร้างเม็ดสีเมลานินเก็บไว้ในเมลาโนโซมแล้วส่งต่อไปยังเคราติโนไซต์ที่ชั้นล่างสุดของเอพิเดอร์มิสหรือชั้นหนังกำพร้า โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส โดย tyrosine hydroxylase หรือ monophenolase หรือเรียกโดยรวมว่าไทโรซิเนส เอนไซม์ไทโรซิเนสเร่งปฏิกิริยา hydroxylation เปลี่ยน L-tyrosine ไปเป็น 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) จากนั้น L-DOPA ถูกถูกออกซิไดซ์เปลี่ยนเป็น DOPAquinone ซึ่ง DOPAquinone จะทำปฏิกิริยากันเอนไซม์ Glutatione แล้วเปลี่ยนแปลงเป็น cysteinyl DOPA สังเคราะห์ต่อเป็นเมลานินซึ่งมีด้วยกันสองชนิด ได้แก่ ยูเมลานิน (eumelanin) และฟีโอเมลานิน (pheomelanin) ทั้งนี้เม็ดสีเมลานินทั้งสองชนิดมีวิถีการสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน โดยการสังเคราะห์ยูเมลานินซึ่งเป็นเม็ดสีเมลานินสีน้ำตาลหรือสีคล้ำจะอาศัยโปรตีนที่เรียกว่า tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) และเอนไซม์ DOPAchrometautomerase (DCT หรือ TRP-2) เกิดเป็นยูเมลานิน นอกจากนั้นเอนไซม์ tyrosinase-related protient 1 (TYPP1) เร่งปฏิกิริยา 5,6-dihydroxyindole (DHI) เกิดเป็น 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) melanin ซึ่งมีสีน้ำตาล ส่วนอีกวิถีหนึ่งจะอาศัยการ conjugate กันระหว่างโดปาควิโนนกับซีสเตอีน(cysteine) หรือกลูตาไธโอน(glutathione) เพื่อสังเคราะห์เป็นฟีโอเมลานินซึ่งเป็นเม

ลานินที่มีสีเหลือง ดังแสดงในภาพประกอบ 3 เม็ดสีเมลานินที่เกิดขึ้นจะถูกส่งไปเก็บไว้ยังเมลาโนโซม จากนั้นจะถูกขนส่งไปตามเดนไดรต์ เพื่อส่งเม็ดสีไปที่ keranocyte ซึ่งอยู่ใต้ชั้นผิวหนังโดยปกติ ผิวหนังของคนเราจะมีรอบในการผลัดเซลล์ผิวประมาณ 28-39 วัน จากนั้นจะเกิดสร้างเซลล์ผิวหนังขึ้นมาใหม่ เพื่อให้เกิดความกระจ่างใสของผิว ถ้าหากไม่เป็นไปตามกระบวนการดังกล่าว จะทำให้ผิวหนังเกิดความหมองคล้ำขึ้น (ประไพพิศ อินเสน, 2561)



ภาพประกอบ 3 กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (DHI คือ 5,6-dihydroxyindole; DHICA คือ 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid ; TRP-1 คือ tyrosinase related protein-1; TRP-2 คือ tyrosinase related protein-2) (ที่มา: ประไพพิศ อินเสน, 2561)

5.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส หรือการยับยั้งการสร้างเม็ดสีผิว เนื่องจากเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสร้างเม็ดสีผิว การทดสอบสามารถใช้วิธี dopachrome method เป็นการอาศัยการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นคือ L-DOPA ซึ่งจะถูกเอนไซม์ไทโรซิเนส เปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาลซึ่งสารละลายนี้จะดูดกลืนคลื่นแสงที่ 492 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างมีความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูง ความเข้มข้นของสารละลายสีน้ำตาลก็จะ

ลดลง ซึ่งอาจจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% inhibition concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ครึ่งหนึ่ง ในการรายงานค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็น ค่า IC_{50} ทำได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % tyrosinase inhibition กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ขวัญจิต อิสระสุข, 2558; มูฮำหมัด นิยมเดชา, 2559)

2.6 โรคที่เกิดจากเชื้อ *C. acnes*

C. acnes (หรือชื่อเดิมคือ *Propionibacterium acnes*) (ณัฐวุฒิ ลีลากนก, 2561) จัดอยู่ในกลุ่ม anaerobic corynebacteria เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวก รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เป็นเชื้อที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ถ้ามีอากาศก็สามารถทนได้ เป็นเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่บริเวณผิวหนัง *C. acnes* เป็นสาเหตุของการเกิดสิว โดยเชื้อ *C. acnes* จะมีการสร้างไลเปสส่งผลให้ลิปิดที่ผิวหนังเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน ทำให้เนื้อเยื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในบริเวณที่มีเชื้อ *C. acnes* นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณลิ้นหัวใจเทียม (prosthetic heart valve) และติดเชื้อบริเวณท่อระบายน้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid shunt) (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2556)

2.6.1 โครงสร้างของผิวหนังและสาเหตุการเกิดสิว

ผิวหนังมนุษย์เป็นอวัยวะที่มีพื้นที่มากที่สุดในร่างกาย ผิวหนังประกอบด้วยชั้นจำนวน 2 ชั้น ได้แก่ epidermis และ dermis โดยมีชั้นนอกสุดคือชั้น epidermis ประกอบด้วย cornified keratinocyte ที่เรียกว่า stratum corneum และเซลล์ที่ตายแล้ว มีการหลุดลอกและแทนที่ตลอดเวลา ชั้นถัดมาคือชั้น dermis ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน พบคอลลาเจนและไฟเบอร์ที่ทำให้เกิดการยืดหยุ่น ในชั้นนี้จะพบ เส้นเลือด เส้นประสาท และต่อมเหงื่อ มักพบการติดเชื้อในชั้นนี้มากที่สุด ซึ่งชั้นผิวหนังบางส่วนจะมีรูขุมขน และต่อมต่างๆ แทรกอยู่ ชั้นนอกสุดจะมี cuticle ลักษณะคล้ายไข เป็นที่ยึดเกาะสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นเกาะ โดยทั่วไป จุลินทรีย์ที่ผิวหนังมี 2 ประเภท คือ จุลินทรีย์ที่เกาะอยู่ผิวหนังด้านนอก เกิดจากการสัมผัสในชีวิตประจำวัน มักเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่อาศัยอยู่ในร่างกาย อีกประเภทหนึ่งคือ จุลินทรีย์ที่เจริญในชั้น epidermis และในต่อมเหงื่อ รวมทั้ง follicle

พยาธิสรีรวิทยาของการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน

การติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อนเกิดได้ 2 ทางหลักดังนี้

1) เกิดจากการฉีกขาดหรือเกิดบาดแผลที่ผิวหนัง ทำให้แบคทีเรียประจำถิ่นบนผิวหนังหรือเชื้ออื่นๆ ผ่านเข้าสู่ชั้นใต้ผิวหนังเพื่อก่อโรคได้ และเชื้อเหล่านี้อาจแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดได้

2) เกิดจากการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรีย (meningococcal rash, rickettsial macules) เชื้อไวรัส (หัด,อีสุกอีใส) ในกระแสเลือดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง

ปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน ได้แก่ จำนวนเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนังมีปริมาณมาก การทำลายชั้นผิวหนังบริเวณที่มีความชื้นสูง เกิดการอักเสบที่บริเวณผิวหนังทำให้เกิดการติดเชื้อต่างๆ เช่น ฝี แผลติดเชื้อ หรือสิวชนิดต่างๆ โดยสิวเกิดจากปัจจัยหลัก 4 ประการ ได้แก่ การอักเสบที่ผิวหนังเนื่องจากการสร้าง cytokine จาก CD^{4+} T cell และ macrophages โดยเป็นตัวกระตุ้นให้เยื่อบุผิวบริเวณรูขุมขนสร้างสารก่อการอักเสบ รูขุมขนอุดตันที่เกิดจากการสร้างเคราตินที่ผิวหนังชั้นนอกร่วมกับการที่ผิวหนังลุดลอกทำให้เกิดหัวสิวอุดตัน หรือสาเหตุจากการที่ผิวหนังสร้างไขมันมากเกินไปเกิดจากฮอร์โมนและสารตัวกลาง เช่น แอนโดรเจนและโกรทฮอร์โมน และสาเหตุที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *C. acnes* เป็นสาเหตุการกระตุ้นการอักเสบ โดยการเกิดสิวอาจพบได้ทุกช่วงวัย ซึ่งการเกิดสิวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์มีความจำเป็นที่จะต้องใช้ยาปฏิชีวนะหรือผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่ใช้ในการรักษาสิว

แนวทางการรักษาหากเป็นสิวชนิดไม่อักเสบอาจใช้การรักษาแบบยา retinoid มีฤทธิ์ลดการสร้างเซลล์รูขุมขน ลดการสร้างเคราติน เร่งการสลายหัวสิว และต้านการอักเสบ ยากลุ่มนี้ได้แก่ adapalene, tazarotene และ tretinoin มีผลข้างเคียงทำให้ผิวหนังชั้น stratum corneum บางลงและอาจทำให้ผิวหนังไวต่อแสงแดด แนะนำให้ทาแล้วล้างออก ทาเฉพาะตอนกลางคืน แต่ถ้าเป็นสิวที่เกิดจากเชื้อ *C. acnes* อาจใช้เป็นการรักษาด้วย ยา benzoyl peroxide ชนิดทา ยาปฏิชีวนะชนิดทา ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทาน Isotretinoin ชนิดรับประทาน หรือยาคุมกำเนิดชนิดรับประทานแล้วแต่ระดับความรุนแรงของการเกิดสิว นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2556)

2.7 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ของน้ำมันหอมระเหย มีการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยมหาหงส์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* และ *Staphylococcus epidermis* โดยทดสอบด้วยวิธี disc diffusion และวิธี Broth microdilution assay ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar (MHA) โดยมี Erythromycin (15 μg/disc), Amoxicillin (30 μg/disc) และ Tetracycline (30 μg/disc) เป็น positive control พบว่า น้ำมัน

หอมระเหยมหาหงส์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อ *C. acnes* และ *S. epidermis* ได้ แต่น้อยว่ายาปฏิชีวนะที่เป็นกลุ่มควบคุมบวก (นลิน วงศ์ขัตติยะ และคณะ, 2559) นอกจากนั้นมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* จากน้ำมันหอมระเหย 22 ชนิด ทดสอบโดยใช้วิธี disc diffusion และ agar dilution methods โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain heart infusion ผสมกับ 1% glucose กลุ่มควบคุมบวก คือ Clindamycin (2 µg/disc), Erythromycin (15 µg/disc), Tetracycline (30 µg/disc) พบว่าน้ำหอมระเหยจากสมุนไพร 19 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* โดย Lemongrass oil (*Cymbopogon citratus* (DC.) Staphf) และ Citronella oil (*Cymbopogon nardus* L.) มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ดีที่สุด (MIC = 0.125% v/v) โดยที่ Lemongrass oil สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดและสูงกว่ายาปฏิชีวนะที่เป็นสารมาตรฐาน (Luangnarumitchai et al, 2007) และยังมีตัวอย่างการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ดังตาราง 2

ตาราง 2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ของน้ำมันหอมระเหย

สมุนไพรตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes*			แหล่งอ้างอิง
	Inhibition Zone (mm.)	MIC	MBC	
Hedychium coronarium	63.33 ± 4.04	0.24 µg/ml	0.48 µg/ml	(นลิน วงศ์ขัตติยะ และคณะ, 2559)
Cymbopogon citratus (DC.) Staphf	36.9 ± 3.8	0.125% v/v	-	(Luangnarumitchai , 2007)
Cymbopogon nardus L.	19.5 ± 0.5	0.125% v/v	-	(Luangnarumitchai , 2007)
Trachyspermum ammi (L.) Sprague	85.00 ± 0.00	3.555 mg/ml	-	(วันวิสาข์ คุณะวัฒนกุล และคณะ, 2560)
Cuminum cyminum L.	41.66 ± 2.88	3.768 mg/ml	-	(วันวิสาข์ คุณะวัฒนกุล และคณะ, 2560)
Curcuma longa L.	11.0 ± 0.1	> 4% v/v	-	(Luangnarumitchai , 2007)
Alpia galangal (L.) Swatz	9.8 ± 2.0	> 4% v/v	-	(Luangnarumitchai , 2007)
Zingiber offinale Roscoe	9.6 ± 0.7	> 4% v/v	-	(Luangnarumitchai , 2007)

พหุนํ ปญฺ ญา ชีเว

2.8 หลักการเตรียมครีม

ครีมเป็นระบบอิมัลชัน ที่ประกอบด้วยของเหลว 2 วัฏภาคคือวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน ทั้งสองวัฏภาคจะไม่ละลายเข้ากัน แต่อาศัยสารเชื่อมประสานเรียกว่า สารก่ออิมัลชัน (Emulsifier or Emulsifying agent) สารชนิดนี้จะทำให้ทั้งสองวัฏภาคผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน โดยระบบของอิมัลชัน แบ่งออกเป็น 2 วัฏภาค ได้แก่ วัฏภาคน้ำ (water phase) ประกอบไปด้วย สารออกฤทธิ์ที่ละลายในน้ำ สารเพิ่มความชุ่มชื้น สารเพิ่มความหนืด สารกันเสีย สารแต่งสีที่ละลายในน้ำ สารแต่งกลิ่น หรือน้ำในตำรับและวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) ประกอบด้วย น้ำมันที่เป็นของเหลว (น้ำมันระเหย ขี้ผึ้ง สารออกฤทธิ์ที่ละลายในน้ำมัน) น้ำมันชนิดของแข็ง (paraffin, beeswax) สารต้านออกซิเดชัน อิมัลชัน แบ่งตามความหนืดได้เป็น 2 ชนิดได้แก่ โลชัน มีคุณสมบัติความหนืดต่ำ โดยมีวัฏภาคภายนอกปริมาณสูงในตำรับ วัฏภาคภายในไม่เกิน 35% และ ครีม ความหนืดจะสูงกว่าโลชัน วัฏภาคภายในไม่เกิน 35%-75% ซึ่งครีมจะมีสารจำพวกไข หรือกรดไขมัน เป็นสารเพิ่มความหนืด

2.8.1 ชนิดของอิมัลชันแบ่งออกเป็น 3 ชนิด

2.8.1.1 Conventional emulsions มีสองลักษณะคือ oil in water emulsions (O/W) ลักษณะของเนื้อจะไม่เหนียวเหนอะหนะ ล้างออกง่าย นิยมทำเป็นเครื่องสำอางประเภทครีมหรือโลชัน และ water in oil emulsions (w/o) เนื้อครีมเหนียวเหนอะหนะ ล้างออกยาก นิยมนำมาทำโฟมล้างหรือครีมที่ต้องการความชุ่มชื้นสูง

2.8.1.2 Multiple emulsions คือ water in oil in water emulsions (W/O/W) หมายถึงระบบอิมัลชัน w/o กระจายตัวใน วัฏภาคน้ำ และ oil in water in oil emulsions (O/W/O) หมายถึงระบบ อิมัลชัน o/w กระจายตัวในวัฏภาคน้ำมัน

2.8.1.3 Microemulsions เป็นอิมัลชันที่มีขนาดเล็ก 10-140 nm เป็นสารละลายโปร่งใส

2.8.2 ส่วนประกอบของครีม

2.8.2.1 Fatty alcohol เป็นสารให้ความหนืดในตำรับ และทำให้ผิวนุ่ม เช่น cetyl alcohol, stearyl alcohol, oleyl alcohol เป็นต้น

2.8.2.2 Fatty acid เป็นสารให้ความหนืดในตำรับ เคลือบผิวเป็นฟิล์มบาง เช่น stearic acid, butyl stearate, isopropyl myristate เป็นต้น

2.8.2.3 Waxes ทำหน้าเป็นสารให้ความชุ่มชื้นผิว และสารให้ความหนืด เช่น beeswax, paraffin, lanolin เป็นต้น

2.8.2.4 Oil ทำหน้าเป็นสารให้ความชุ่มชื้นผิว และเพิ่มความชุ่มชื่น ป้องกันการระเหยของน้ำออกจากผิวหนัง เช่น mineral oil, vegetable oil หรือ natural oil เป็นต้น

2.8.2.5 Moisturizers และ humectants ทำหน้าเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิว โดยการดึงน้ำเข้าหาตัวเอง เช่น glycerin, sorbitol หรือ propylene glycol

2.8.2.6 Polymers เป็นสารช่วยให้ตำรับมีความคงตัว เช่น carbomers, xanthan gum เป็นต้น

2.8.2.7 สารก่ออิมัลชัน เป็นสารที่เป็นตัวเชื่อมผสานระหว่างวัฏภาคน้ำมัน และ วัฏภาคน้ำ ตัวอย่างสาร emulsifiers ดังแสดงในตาราง 3

2.8.2.8 สารกันเสียในตำรับ เช่น benzoic acid, paraben, propyl paraben หรือ Bronopol เป็นต้น

2.8.2.9 สารต้านออกซิเดชัน ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของตำรับ เช่น ascorbic acid, vitamin E, butylated hydroxytoluene (BHT) เป็นต้น

ตาราง 3 สารก่ออิมัลชันที่นิยมใช้ในตำรับครีม (ที่มา: วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ, 2555)

ชนิด emulsifiers	**ตัวอย่างสาร**
Anionics	Sodium lauryl sulfate, potassium cetyl phosphate , triethanolamine stearate
Cationics	cetyl pyridinium chloride, Quaternary ammonium compound ไม่นิยมใช้กับผิวหนัง เนื่องจากเกิดการระคายเคืองต่อผิว
Nonionics	ก่อให้เกิด o/w emulsion เช่น sorbitan monostearate , glyceryl monostearate, PEG ester of fatty acids, polysorbates ก่อให้เกิด w/o เช่น sorbitan monooleate, Glycerol monoleate

2.8.3 ขั้นตอนการเตรียมครีม

แบ่งส่วนประกอบของตำรับออกเป็นวัฏภาคน้ำมันและวัฏภาคน้ำ ให้ความร้อนแก่ทั้งสองวัฏภาค โดยให้ วัฏภาคน้ำ มีอุณหภูมิสูงกว่า วัฏภาคน้ำมัน 2-3 °C และให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 75 °C ถ้าเตรียมครีมชนิด o/w ให้เทวัฏภาคน้ำมัน ลงในวัฏภาคน้ำ แต่ถ้าถ้าเตรียมครีมชนิด w/o ให้เทวัฏภาคน้ำ ลงในวัฏภาคน้ำมัน แล้วคนจนกว่าอุณหภูมิลดลงเหลือ 40-50 °C แล้วจึงเติมสารออกฤทธิ์หรือสารที่ระเหยง่าย แล้วเติมสารกันเสีย (ดวงกมล เลียวกิตติกุล และคณะ, 2553)

2.8.4 การทดสอบความคงตัวของตำรับครีม

2.8.4.1 การประเมินคุณภาพของตำรับ เป็นขั้นตอนการศึกษาความคงตัวของครีม เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่น ความคงตัวของตำรับแบ่งออกเป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

1) ความคงตัวของตำรับทางเคมี หมายถึง ตำรับที่มีตัวยาสำคัญอยู่ครบตามปริมาณที่ใส่ในตำรับ ไม่เกิดการสลายตัว

2) ความคงตัวทางกายภาพ หมายถึง ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ตำรับไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเริ่มต้น เช่น รูปร่างลักษณะของเนื้อครีม สี กลิ่น

3) ความคงตัวด้านจุลชีววิทยา หมายถึง ตำรับต้องคงความปราศจากเชื้อ หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ในเกณฑ์ที่กำหนด เมื่อเวลาผ่านไป

4) ความคงสภาพของประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ตลอดอายุการใช้งาน

5) ความคงสภาพทางพิษวิทยา หมายถึง ระดับความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ยาไม่มีการเปลี่ยนแปลง

หัวข้อการประเมินทางกายภาพและทางของครีมที่ควรประเมิน เช่น ความหนืดและคุณสมบัติของการไหล ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค การสูญเสียน้ำและสารระเหยจากตำรับครีม การเปลี่ยนแปลงของ phase to volume ratio ค่า pH ความเนียนของเนื้อครีม และการแยกชั้น ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ (active ingredient)

2.8.4.2 การทดสอบความคงตัวแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 วิธี ได้แก่

1) สภาวะเร่ง (Accelerated storage condition) เป็นการศึกษาเพื่อเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวหรือการเปลี่ยนแปลงของตำรับ เป็นการเก็บตัวอย่างในสภาวะที่รุนแรงมากกว่าความเป็นจริง โดยการเพิ่ม อุณหภูมิ แสง ความชื้น แล้วสังเกตผลที่เกิดขึ้น

1.1) การทดสอบสภาวะเร่งแบบใช้อุณหภูมิต่ำสลับสูง วิธีการนี้เป็นการทดสอบดูความคงทนต่ออุณหภูมิที่นอกเหนือจากอุณหภูมิในสภาวะปกติ หากตำรับไม่มีความคงตัว ครีมจะเกิดการแยกชั้น ตกตะกอน หรือน้ำกลายเป็นเกล็ดแยกออกจากน้ำมัน มีการทดสอบได้ 2 ลักษณะคือ

- Heating cooling cycle เป็นวิธีการทดสอบโดยเก็บตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4±2 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วสลับมาเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 45±2 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ 75±5 % RH นับเป็น 1 รอบ ทดสอบทั้ง 6-8 รอบ แล้วประเมินผล

- Freeze thaw cycling ทดสอบโดยเก็บตัวอย่างในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 ± 2 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วสลับมาเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 25±2 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ 75±5 % RH นับเป็น 1 รอบ ทดสอบทั้ง 6-8 รอบ แล้วประเมินผล

1.2) การทดสอบสภาวะเร่งแบบใช้แสง โดยแสงอาจเร่งให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมี เกิดการซีดของสีตำรับ

1.3) การทดสอบสภาวะเร่งแบบใช้แรงโน้มถ่วง โดยวิธีการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) หรือการเขย่า (shake) เป็นวิธีการเร่งการตกตะกอนของตำรับ หรือการแยกชั้นของครีม

2) สภาวะการเก็บรักษาจริง (Real time storage condition) เป็นการศึกษาความคงตัวแบบระยะยาวตลอดอายุของผลิตภัณฑ์ ทำการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิ 30±2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75±5 % RH ระยะเวลาในการศึกษาสภาวะการเก็บรักษาจริงได้ 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 และทุก 24 เดือนจนกว่าจะสิ้นอายุ

2.8.4.3 การประเมินความคงตัว

หลังจากการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะต่างๆ แล้ว ต้องมีการประเมินความคงตัวทุกครั้งก่อนและหลังการทดสอบ โดยการประเมินความคงตัวของครีมสามารถแบบแบ่งออกเป็น 3 หัวข้อดังนี้

1) การประเมินลักษณะทางเคมี ได้แก่ การวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญ ปริมาณของสารกันเสีย ปริมาณสารปนเปื้อนและการสลายตัวของสารในตำรับ

2) การทดสอบทางจุลชีววิทยา ในสภาวะเร่งอย่างน้อย 6 เดือน และสภาวะจริงทุกปีจนครบระยะของการศึกษา

3) การทดสอบทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะทั่วไปของตำรับ กลิ่น สี การแยกชั้น ความเนียน วัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Brookfield viscometer

2.8.4.4 ลักษณะของยาที่เสื่อมสภาพ

การเปลี่ยนแปลงเพียงบางส่วนของตำรับอาจส่งผลให้เกิดปัญหาความไม่คงตัวของตำรับได้ โดยการเปลี่ยนแปลงที่สามารถสังเกตและบ่งบอกความไม่คงสภาพของตำรับ ดังตาราง 4

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ตาราง 4 ตัวอย่างการเสื่อมสภาพของยารูปแบบต่างๆ (ที่มา: ชนินดา เพชรสังฆาต, 2558; เสาวนีย์ กระสานสันติ, 2549)

รูปแบบยา	ลักษณะของความไม่คงตัวของตำรับ
ครีม (creams)	การแยกชั้นของเนื้อครีม เนื่องจากการระเหยของน้ำ เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตเกินเกณฑ์ที่กำหนด สีเปลี่ยนไป กลิ่นเหม็นหืน ความหนืดเปลี่ยนไป
อิมัลชัน (Emulsions)	การแยกชั้นของวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน
ขี้ผึ้ง (Ointments)	การแยกชั้นของผลิตภัณฑ์
ยาน้ำใสหรือยาน้ำเชื่อม (Solutions or syrups)	ขุ่น การเจริญของเชื้อ การเกิดก๊าซ การเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยประกอบด้วยการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้นและส่วนใต้ดิน โดยศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* และพัฒนาเป็นเวชสำอางสำหรับใช้ภายนอกในรูปแบบครีมจากส่วนที่มีฤทธิ์ดีที่สุด

3.1 รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study)

3.2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

3.2.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยและศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

3.2.1.1 ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย (water distillation)

3.2.1.2 เครื่อง GC-MS (GC: Bruker 450GC; MS: Bruker 320MS, U.S.A)

3.2.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius LE 2445, Germany)

3.2.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius LE 2445, Germany

3.2.1.5 Pasture pipette

3.2.1.6 น้ำกลั่นปราศจากไอออน (DI water)

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH assay

3.2.2.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS microplate reader) (SPECTROstar Nano, Germany)

3.2.2.2 เครื่องแก้ว เช่น Erlenmeyer flask, beaker, cylinder, volumetric flask

3.2.2.3 96-well plate

3.2.2.4 Tip 100, 200 และ1000 µL

3.2.2.5 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Carlo Erba reagent, France)

3.2.2.6 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich®, USA)

3.2.2.7 α-tocopherol (Sigma-Aldrich®, USA)

3.2.2.8 Ascorbic acid (Sigma-Aldrich®, USA)

3.2.2.9 Methanol (Merck, Germany)

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี FRAP assay

3.2.3.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS microplate reader) (SPECTROstar Nano, Germany)

3.2.3.2 เครื่องแก้ว เช่น Erlenmeyer flask, beaker, cylinder, volumetric flask

3.2.3.3 96-well plate

3.2.3.4 Tip 100, 200 และ1000 µL

3.2.3.5 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Carlo Erba reagent, France)

3.2.3.6 Absolute ethanol (RCI Labscan, ประเทศไทย)

3.2.3.7 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) (Merck, Germany)

3.2.3.8 Sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$) (RCI Labscan, ประเทศไทย)

3.2.3.9 Glacial acetic acid (RCI Labscan, ประเทศไทย)

3.2.3.10 Hydrochloric acid (HCl) (RCI Labscan, ประเทศไทย)

3.2.3.11 Ferric chloride ($FeCl_3$) (Merck, Germany)

3.2.3.12 Ferrous sulphate ($FeSO_4$) (AnalaR NORMAPUR®, UK)

3.2.3.13 α-tocopherol (Sigma-Aldrich®, USA)

3.2.3.14 Ascorbic acid (Sigma-Aldrich®, USA)

3.2.3.15 น้ำกลั่นปราศจากไอออน (DI water)

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.2.4.1 เครื่องแก้ว เช่น Erlenmeyer flask, beaker, cylinder, volumetric flask

3.2.4.2 96-well plate

3.2.4.3 Tip 100, 200 และ1000 µL

3.2.4.4 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Carlo Erba reagent, France)

3.2.4.5 Kojic acid (Sigma-Aldrich®, U.S.A)

3.2.4.6 Tyrosinase from mushroom Lyophilized powder (Sigma-Aldrich®, U.S.A)

3.2.4.7 Dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4. $2H_2O$) (Sigma-Aldrich®, U.S.A)

3.2.4.8 Monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4. $2H_2O$) Sigma-Aldrich®, U.S.A)

3.2.4.9 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) (Sigma-Aldrich®, U.S.A)

3.2.4.10 น้ำกลั่นปราศจากไอออน (DI water)

พหูน ปณฺ ศิโต ชีเว

3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes*

3.2.5.1 ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 Incubator) (Thermo Fisher Scientific, U.S.A)

3.2.5.2 Laminar air flow (Kendro, Germany)

3.2.5.3 เครื่องแก้ว เช่น Erlenmeyer flask, beaker, cylinder, petri dish และ test tubes

3.2.5.4 กระดาษกรองเบอร์ 1 (WhatmanTM)

3.2.5.5 เชื้อ *C. acnes* DMST 14916 จากกรมวิทยาศาตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.2.5.6 Brain heart infusion (HiMedia®, India)

3.2.5.7 Brain heart infusion broth (HiMedia®, India)

3.2.5.8 Paper disc (Marcerey-Nagel, Germany)

3.2.5.9 tetracycline (Oxoid, UK)

3.2.5.10 น้ำกลั่นปราศจากไอออน (water DI)

3.2.5.11 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius LE 2445, Germany)

3.2.5.12 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Carlo Erba reagent, France)

3.2.6 การพัฒนาเวชสำอาง ในรูปแบบครีม

3.2.6.1 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Thermo Fisher Scientific, U.S.A)

3.2.6.2 เครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscometer) (Brookfield, U.S.A)

3.2.6.3 Stearic acid (Sigma-Aldrich®, U.S.A)

3.2.6.4 Cetyl alcohol (บ.เคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)

3.2.6.5 Mineral oil (บ.เคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)

3.2.6.6 Glyceryl monosterate (บ.เคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)

3.2.6.7 Triethanolamine (RCI Labscan, ประเทศไทย)

3.2.6.8 Glycerin (บ.เคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)

3.2.6.9 Carbomer 940, Carbopol 934 (บ.เคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)

3.2.6.10 Propylene glycol (บ.เคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)

3.2.6.11 Polysorbate 80 (บ.เคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)

3.2.6.12 Sorbitan oleate (บ.เคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)

พหุน ปญฺญา ชีเว

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (water distillation)

1) การเตรียมสมุนไพร

ซื้อต้นว่านสาวหลงแบบต้นสดอายุ 2 ปี เก็บในเดือนตุลาคม ช่วงเวลาการเก็บ 8.00 น. – 10.00 น. จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมากพระราชดำริ ตำบลเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา พิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมากพระราชดำริ นำมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ โดยแยกออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนใต้ดิน (ไหล ราก) และส่วนทั้งต้น ดังแสดงในภาพประกอบ 3 แล้วนำไปอบด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชม. แล้วนำไปบดหยาบด้วยเครื่องบดสมุนไพร ร่อนผงว่านสาวหลงด้วยแร่งเบอร์ 60

ว่านสาวหลงส่วนใต้ดิน(ไหล ราก)

ว่านสาวหลงส่วนทั้งต้น

ภาพประกอบ 4 ว่านสาวหลงส่วนใต้ดิน (ไหล ราก) และส่วนทั้งต้น ของว่านสาวหลง

2) การกลั่นน้ำมันหอมระเหยด้วยน้ำ (water distillation)

นำสมุนไพรที่บดผงแล้วมาสกัดน้ำมันหอมระเหยตามวิธีของ Thai herbal pharmacopoeia (Department of Medical Sciences, 2016) ทำได้โดยนำผงสมุนไพรว่านสาวหลงจำนวน 100 กรัมลงในขวดก้นกลมขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 600 มิลลิลิตร

ใช้ความร้อนในการกลั่นน้ำมันหอมระเหยที่อุณหภูมิระหว่าง 130–150 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้จนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วเปิด stopper of the apparatus เพื่อปล่อยน้ำออกจากน้ำมันหอมระเหย โดยที่น้ำมันหอมระเหยจะลอยอยู่เหนือน้ำ จากนั้นปล่อยน้ำออกจนน้ำมันหอมระเหยจนหมด แล้วนำน้ำมันที่กลั่นได้มาชั่งน้ำหนักและคำนวณหาปริมาณน้ำมันที่ได้ (% yield) เก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในขวดแก้วปิดฝาสนิทที่อุณหภูมิ -20 °C

สูตรการคำนวณหาปริมาณสารสกัดที่ได้ (% yield) คำนวณโดยใช้สูตร

$$\% \text{ yield (w/w)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่ได้}}{\text{น้ำหนักผงสมุนไพรแห้งที่ใช้}} \times 100$$

3.3.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี

การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง ด้วย GC-MS (ดัดแปลงจาก Dai, et al., 2016) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยใช้เครื่องมือ GC-MS (GC: Bruker 450GC; MS: Bruker 320MS, USA) คอลัมน์ชนิด Rtx-5MS capillary column (Restek, USA, 30 m, 0.25 mm, fused silica 0.25 μm) ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 2 μL อุณหภูมิที่ฉีดสารตัวอย่างเท่ากับ 250 °C ใช้ split mode Electron ionization เป็น ion source ควบคุมอุณหภูมิที่ 230 °C Electron energy เท่ากับ 70 eV ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพาที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 mL/min ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิของเครื่อง แบบลำดับส่วนเริ่มจาก 60 °C เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 °C ด้วยอัตรา 3.0 °C/min เป็นเวลา 57.56 นาที จากนั้นนำสเปกตรัมที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ mass spectra index ของ Mass Spectral Libraries (NIST Libraries, 2008

3.3.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

3.3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก Clarke, *et al*, 2013*;* สุชาดา มานอก, 2558*)*

1) การเตรียมสารตัวอย่าง/สารมาตรฐาน

- นำน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงของส่วนทั้งต้นและส่วนใต้ดิน มาละลายด้วย 10% DMSO ในเมทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 50 mg/mL (stock solution) จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.5, 2.5, 5, 10, 20, 30, และ 40 mg/mL ด้วย 10% DMSO ในเมทานอล

- เตรียมสารมาตรฐาน (α-tocopherol และ ascorbic acid) ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/mL (stock solution) โดยเจือจางสารมาตรฐาน ascorbic acid ให้มีความเข้มข้น 0.25, 0.5,

1, 5 และ 10 µg/mL และเจือจางสารมาตรฐาน α-tocopherol ให้มีความเข้มข้น 0.5, 1, 2.5, 10 และ 20 µg/mL โดยเจือจาง10% DMSO ในเมทานอล

2) การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

- เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ในเมทานอล ปิเปตน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงหรือสารมาตรฐาน แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 µL ผสมให้เข้ากันกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL ใส่ใน 96-well plate ตั้งทิ้งไว้ที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ หาค่า % radical scavenging จากสูตร

$$\%\ \text{radical scavenging} = \frac{\text{ODcontrol} - (\text{OD sample/standard} - \text{ODblank sample/standard})}{\text{ODcontrol}} \times 100$$

เมื่อ $OD_{control}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย 10% DMSO ในเมทานอล $OD_{sample/standard}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันหอมระเหยหรือสารมาตรฐาน $OD_{blank\ sample/standard}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันหอมระเหยหรือสารมาตรฐานที่ไม่เติมสาร DPPH สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงกับ % radical scavenging แล้วหาค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงที่สามารถทำลาย DPPH ไปครึ่งหนึ่ง โดยสารมาตรฐาน α-tocopherol และ ascorbic acid เป็น กลุ่มควบคุมบวก

3.3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP (ดัดแปลงจาก พัชรินทร์ บุญหล้า และคณะ 2557)

1) การเตรียม FRAP reagent

- นำสารละลาย 300 mM acetate Buffer pH 3.6 สารละลาย 10 mM TPTZ และ 20 M เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) มาผสมด้วยอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ จะได้ FRAP reagent

2) เตรียมสารละลายน้ำมันหอมระเหยว่านส่วนหลงและสารมาตรฐาน

- นำน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงของส่วนทั้งต้นและส่วนใต้ดิน ใช้ 10%DMSO ใน ethanol เป็นตัวทำละลาย เตรียมให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 และ800 µg/mL

- เตรียมสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 µg/mL และ α-tocopherol ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 400 µg/mL โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย

- เตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟส ($FeSO_4$) โดยเจือจางสาร $FeSO_4$ ให้มีความเข้มข้นในช่วง 0, 25, 50, 100, 200, 400 และ 800 µg/mL โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

3) การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay

- การทดสอบทำได้โดยปิเปตสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 240 µL ผสมกับน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงหรือสารมาตรฐานปริมาตร 8 µL ลงใน 96 well plate ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงของสารผสมที่ได้ที่ความยาวคลื่น 593 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis microplate reader

- สร้างกราฟมาตรฐานสารละลาย $FeSO_4$ โดยปิเปตสารละลาย FRAP ปริมาตร 240 µL ผสมกับสารละลาย $FeSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 8 µL ลงใน 96 well plate ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ $FeSO_4$ โดยแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm แกน X คือค่าความเข้มข้นของ $FeSO_4$ และหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในคำนวณฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันหรือ FRAP value ในเหน่วยมิลลิโมลาร์ Fe^{2+} equivalents/g ของสาร จากสูตร

$$\text{FRAP value} = [(A - B) / M]$$

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 593 nm

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสไอออน

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสไอออน

3.3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีการ dopachrome method (ดัดแปลงจาก กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2553)

1) เตรียมสารละลายน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงและสารมาตรฐาน

- เตรียมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง ให้มีความเข้มข้น 10 mg/mL (stock solution) จากนั้นเจือจางน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงให้มีความเข้มข้น ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 50, 100, 200, และ 300 µg/mL

- สารมาตรฐาน kojic acid มีความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 µg/mL โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย

พหุุนํ ปณฺ ตํ ชีวํ

2) การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

- ปิเปตน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงหรือสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 µL ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 100 µL เอนไซม์ไทโรซิเนส (31 unit/mL) โดยใช้ phosphate buffer pH 6.8 เป็นตัวทำลาย ปริมาตร 50 µL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 2.5 mM L-DOPA ปริมาตร 50 µL ลงในแต่ละหลุม ดังแสดงในตาราง 5 แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader โดยจะทำกระบวนการดังกล่าวกับทุกความเข้มข้นที่กล่าวข้างต้น คำนวณหาร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสูตร

$$\%\ \text{tyrosinase inhibition} = \frac{(A-B)-(C-D)}{A-B} \times 100$$

เมื่อ A, B, C, D คือค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่ม A, B, C, และ D ดังแสดงในตาราง 5 จากนั้นสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร กับ % tyrosinase inhibition แล้วหาค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ครึ่งหนึ่ง ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

ตาราง 5 ชนิดและปริมาณสารที่ใส่ลงในหลอด A,B,C,D

กลุ่มทดลอง	10% DMSO ใน glycerin	0.1 M Phosphate buffer (pH6.8)	Tyrosinase Enzyme 31 unit/mL	ว่านสาวหลงใน 10% DMSO / สารมาตรฐาน
กลุ่ม A	50 µL	100 µL	50 µL	-
กลุ่ม B	50 µL	150 µL	-	-
กลุ่ม C	-	100 µL	50 µL	50 µL
กลุ่ม D	-	150 µL	-	50 µL

3.3.3.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes*

1) การทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion method ดัดแปลงจาก (วันวิสาข์ คุณะวัฒนกุล และคณะ, 2560)

1.1) การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบและการเตรียมอาหารเพาะเชื้อ

- เชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่ *C. acnes* DMST 14916 เตรียมในหลอดทดลองโดยเพาะเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain Heart Infusion broth (BHI broth) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อสำหรับทดสอบจำนวนเริ่มต้นเทียบเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 (1x108 CFU/mL)

- การเตรียมอาหารเพาะเชื้อชนิดแข็ง โดยชั่งอาหารเพาะเชื้อชนิดแข็ง Brain Heart Infusion agar (BHI agar) จำนวน 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 mL ตั้งบน hot plate อุ่นจนกลายเป็นสารละลายใส จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่ความดัน 15 lbs อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 45-50 °C แล้วเท BHI agar ลงใน petri dish ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 20 mL ตั้งทิ้งไว้รอจนอาหารแข็งตัว

1.2 การเตรียมสารละลายน้ำมันหอมระเหยและ disc น้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

- เจือจางน้ำมันหอมระเหยของส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้นให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/mL โดยใช้ 10% DMSO ใน glycerin ปิเปตน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 15 μL ลงบนกระดาษกระดาษกรอง (paper disc) ที่ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ปล่อยให้แห้ง

1.3) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion Method

- นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มในอาหารเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ บิดสำลีให้หมาดๆ กับหลอดทดลอง จากนั้น spread เชื้อบน BHI agar ให้ทั่วทั้ง 3 ระนาบ รอให้แห้งประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นวาง disc ที่มีน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงบนจานอาหารเพาะเชื้อ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone หน่วยที่วัดเป็น mm โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส 3 ระนาบ แล้วหาค่าเฉลี่ย ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน tetracycline ที่ความเข้มข้น 15 μg/disc และ กลุ่มควบคุม คือ 10% DMSO หลังจากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนของ inhibition zone จากสูตร

$$\text{อัตราส่วนของ inhibition zone} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสของน้ำมันหอมระเหย}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มควบคุม}}$$

2) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution method

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงโดยวิธี Broth dilution method ดัดแปลงจาก (Wongkattiya et al., 2016; วันวิสาข์ คุณะวัฒนกุล และคณะ, 2560) แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ *C. acnes*

2.1) การเตรียมอาหารเพาะเชื้อ โดยชั่ง BHI broth จำนวน 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL จากนั้นตั้งบน hot plate อุ่นจนกลายเป็นสารละลายใส จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่ความดัน 15 lbs อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เตรียมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ทดสอบจำนวนเริ่มต้นเทียบเท่ากับ McFarland Standard No.0.5 (1×10^8 CFU/mL)

2.2) เตรียมสารละลายน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงและสารมาตรฐาน tetracycline ความเข้มข้น 1 mg/mL (stock solution) โดยใช้ 10% DMSO ใน glycerin จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง มาเจือจางแบบสองเท่าลำดับส่วน (2-fold serial dilution) โดยเจือจางน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 µg/mL และเจือจาง tetracycline ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5 และ 25 µg/mL

2.3) การทดสอบด้วยวิธี Broth dilution method เติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI broth ลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อหลอดที่ 1-6 ปริมาตร 1 mL เติมน้ำมันหอมระเหยหรือสารมาตรฐานลงในหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 mL ดูดสารในหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 mL ลงในหลอดที่ 2 ทำเช่นนี้จนถึงหลอดที่ 6 ดูดสารในหลอดที่ 6 ออก 1 mL เติมเชื้อ *C. acnes* ปริมาตร 1 mL ในหลอดที่ 1-6 โดยหลอดที่ 7 เป็นหลอดที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อที่ทดสอบ หลอดที่ 8 ประกอบด้วย tetracycline อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อที่ใช้ทดสอบ หลอดที่ 9 ประกอบด้วย ตัวทำละลาย (10% DMSO glycerin) อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อที่ใช้ทดสอบ หลังจากนั้นนำหลอดทดลองทุกหลอดไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่า MIC ได้จากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่ใช้ทดสอบที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ของผสมจะใส)

การทดสอบหาค่า MBC ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยนำหลอดทดลองจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดทดลองไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BHI agar สำหรับเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน นาน 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำมันว่านสาวหลงที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) อ่านผลจากการไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.4 การพัฒนาตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

นำผลจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงส่วนที่มีฤทธิ์ดีที่สุดมาพัฒนาตำรับเป็นครีม โดยส่วนประกอบในตำรับดังแสดงในตาราง 6

3.3.4.1 วิธีการเตรียมตำรับ

แบ่งส่วนประกอบของตำรับออกเป็น 2 บีกเกอร์ระหว่าง วัฏภาคน้ำมันและวัฏภาคน้ำ

1) การเตรียมวัฏภาคน้ำมัน โดยหลอมส่วนประกอบที่เป็นวัฏภาคน้ำมัน ให้มีอุณหภูมิ 70 °C

2) การเตรียมวัฏภาคน้ำ โดยโปรยผง Carbomer 940 ลงในน้ำทีละน้อย พร้อมกับคนให้กระจายในน้ำ เติม triethanolamine จนเกิดเจลใสและมี pH เท่ากับ 7 แล้วเติมสารอื่นๆ ในวัฏภาคน้ำ คนให้เข้ากัน ตั้งบน water bath ให้ได้อุณหภูมิ 75 °C

3) เทส่วนผสมวัฏภาคน้ำมัน ลงในบีกเกอร์วัฏภาคน้ำ คนไปเรื่อยๆ อย่างต่อเนื่อง จนถึงอุณหภูมิ 45-50 °C เติมสารละลายของ methyl paraben และ propyl paraben ที่ละลายใน propylene glycol คนให้เข้ากัน เติมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง และบรรจุลงบรรจุภัณฑ์

ตาราง 6 การพัฒนาตำรับครีม

ส่วนประกอบ	หน้าที่ในตำรับ	ปริมาณในสูตร anionic surfactant (%w/w)	ปริมาณในสูตร nonionic surfactant (%w/w)
วัฏภาคน้ำมัน			
Stearic acid	Emulsifier	3-4	-
Cetyl alcohol	Auxiliary emulsifier	2-3	2-3
Mineral oil	Emollient	5-10	2-5
Hard paraffin	Stiffening agent	2-3	2-3
Sorbitan oleate	Emulsifier	-	1-2
วัฏภาคน้ำ			
Polysorbate 80	Emulsifier	-	2-3
Triethanolamine	Emulsifier/pH adjust	2	1.5
Carbopol 940/934	Thickening agent	0.2-0.4	0.2-0.4

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ส่วนประกอบ	หน้าที่ในตำรับ	ปริมาณในสูตร anionic surfactant (%w/w)	ปริมาณในสูตร nonionic surfactant (%w/w)
Propylene glycol	Humectant	5	5
Methyl paraben	Preservative	0.2	0.2
Propyl paraben	Preservative	0.04	0.04
น้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง	API	x	x
DI water	วัฏภาคน้ำ	100	100

3.3.4.2 การควบคุมคุณภาพตำรับครีมว่านสาวหลง

ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตำรับหลังจากเตรียมตำรับเสร็จและหลังผ่านการทดสอบความคงตัวโดยวิธี Heating-Cooling cycle โดยนำตำรับครีมว่านสาวหลงเก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเข้าตู้เย็น 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทั้งหมด 6 รอบ จากนั้นประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ โดยวิธีการสังเกตลักษณะภายนอก ได้แก่ สี กลิ่น ลักษณะเนื้อครีม ความเนียน การแยกชั้นของตำรับ และความเกาะติดผิวและการแพร่กระจายบนผิวหนังหลังจากทา การวัดความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield viscometer และวัดความเป็นกรด-ด่าง โดยเครื่องวัด pH meter

3.4 สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

แสดงข้อมูลที่ได้ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และการทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลโดยทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลค่า IC_{50} ของการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนต่างๆ ของว่านสาวหลง ด้วยสถิติ Shapiro-Wilk ข้อมูลที่ได้มีการกระจายตัวของข้อมูลแบบปกติ

การทดสอบสถิติของข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* โดยทดสอบความแตกต่างของน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน ส่วนทั้งต้นและสารมาตรฐาน ข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง 3 กลุ่มโดยใช้สถิติ One-way ANOVA และทดสอบเปรียบเทียบคู่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย Tukey’s test ค่าระดับนัยสำคัญที่ทดสอบ (P-value) เท่ากับ 0.05

การทดสอบสถิติของข้อมูลค่า pH ของตำรับครีม โดยเปรียบเทียบก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยวิธี heating-cooling cycle มีการกระจายแบบไม่ปกติทดสอบด้วยสถิติ Wilcoxon's sign-rank test ค่าระดับนัยสำคัญที่ทดสอบ (P-value) เท่ากับ 0.05

การทดสอบสถิติของข้อมูลค่าความหนืดของตำรับ โดยเปรียบเทียบก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยวิธี heating-cooling cycle มีการกระจายแบบปกติทดสอบด้วยสถิติ Pair T-test ค่าระดับนัยสำคัญที่ทดสอบ (P-value) เท่ากับ 0.05

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 4
ผลการวิจัย

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนาตำรับเวชสำอางของว่านสาวหลง ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและมีผลการศึกษาวิจัยดังต่อไปนี้

4.1 การกลั่นน้ำมันหอมระเหย

จากการนำว่านสาวหลงมาสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือส่วนใต้ดิน และส่วนทั้งต้น ผงว่านสาวหลงของส่วนส่วนใต้ดิน จำนวน 2,000 กรัม สามารถกลั่นน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง 8.50 กรัม และผงสมุนไพรว่านสาวหลงส่วนทั้งต้น สามารถกลั่นน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง 12.75 กรัม คิดเป็นร้อยละของผลผลิตที่ได้ ดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ร้อยละของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง (% yield) และลักษณะทางกายภาพของว่านสาวหลงจากส่วนใต้ดิน และส่วนทั้งต้น

ส่วนของสมุนไพร	ร้อยละของน้ำมันหอม (% yield)	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะกลิ่น
ส่วนใต้ดิน	0.43	ใส สีเหลืองอ่อน	กลิ่นไม่มีการปลี่ยนแปลง ไม่หืน มีกลิ่นของว่านสาวหลงชัดเจน
ส่วนทั้งต้น	0.64	ใส สีเหลืองอ่อน	กลิ่นไม่มีการปลี่ยนแปลง ไม่หืน มีกลิ่นว่านสาวหลงชัดเจน

4.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี

จากตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนใต้ดิน และส่วนทั้งต้น ด้วยเครื่อง GC-MS พบสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ส่วน ดังแสดงในตาราง 8 ภาพประกอบ 5 และภาพประกอบ 6

พหุนำ ปณฺ ทิโต ชีเว

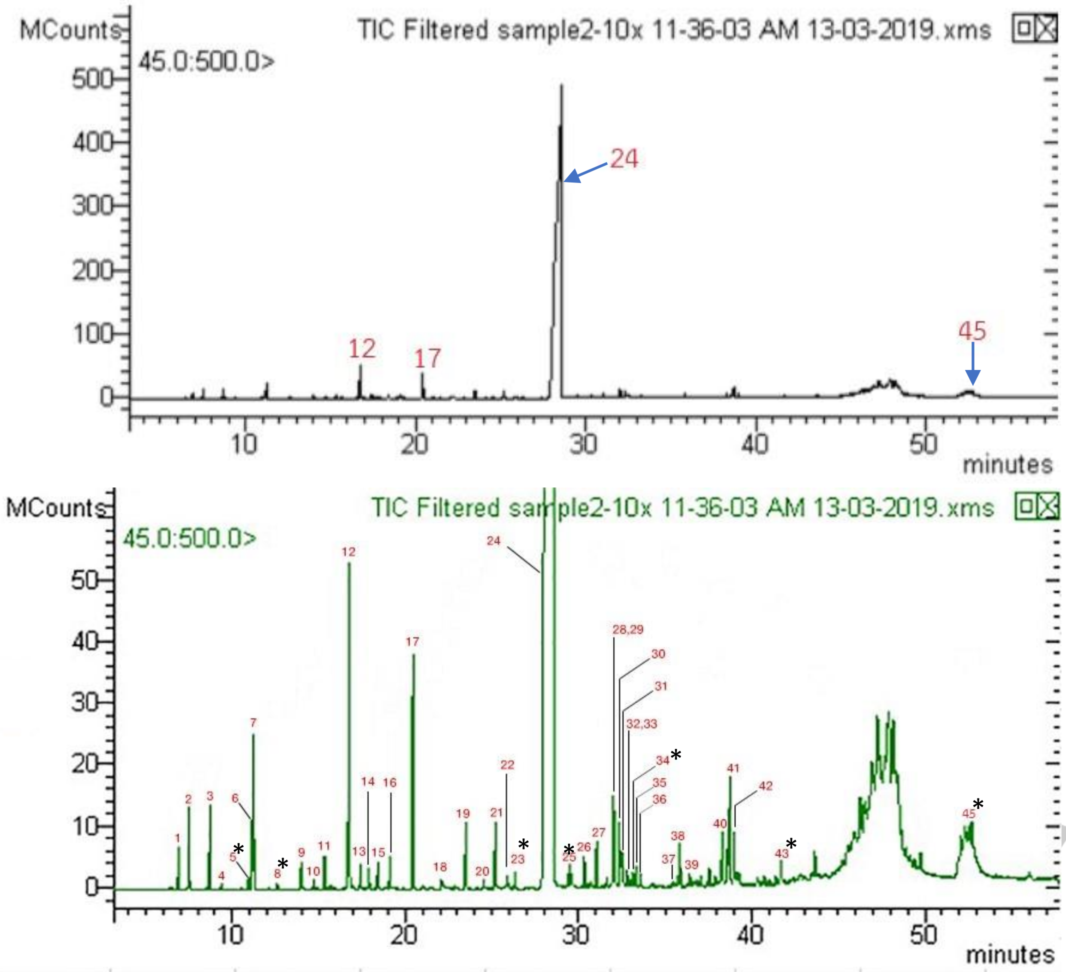
ตาราง 8 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยวิเคราะห์ด้วย GC-MS

ลำดับ	Peak Name	ใต้ดิน		ทั้งต้น	
		RT (min)	%Area	RT (min)	%Area
1	Alpha-Pinene	6.89	0.16	6.896	0.188
2	Camphene	7.49	0.34	7.494	0.377
3	β-Pinene	8.69	0.35	8.698	0.368
4	β-Myrcene	9.39	0.03	9.399	0.029
5	M-Cymene	10.93	0.05	ND	ND
6	Limonene	11.13	0.32	11.132	0.588
7	Eucalyptol	11.23	0.66	11.231	0.429
8	Gamma-Terpinene	12.60	0.02	ND	ND
9	Fenchone	13.99	0.13	13.994	0.024
10	β-Linalool	14.72	0.04	14.723	0.019
11	Fenchol	15.33	0.15	15.334	0.030
12	Camphor	16.75	1.75	16.739	1.387
13	Isoborneol	17.41	0.12	17.413	0.035
14	Endo-Borneol	17.86	0.11	17.873	0.137
15	4-Terpineol	18.40	0.12	18.406	0.079
16	α-Terpineol	19.10	0.15	19.094	0.074
17	Fenchyl acetate	20.42	1.15	20.406	0.157
18	P-Acesaldehyde	22.09	0.08	22.074	0.179
19	Bornyl acetate	23.50	0.41	23.471	0.130
20	P-Acetonylanisole	24.53	0.04	24.532	0.040
21	1-Butene, 2-(O-ANISYL)-	25.18	0.34	25.183	0.387
22	Benzene, 1-methoxy-4-(1-methyl-	25.90	0.08	25.916	0.764

ลำดับ	Peak Name	ใต้ดิน		ทั้งต้น	
		RT (min)	%Area	RT (min)	%Area
	2-propenyl)-				
23	α-Terpineol acetate	26.32	0.08	ND	ND
24	1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene	28.60	86.42	28.621	92.625
25	Caryophyllene	29.40	0.07	ND	ND
26	Naphthalene, 1,2-dihydro-6-methoxy-	29.53	0.09	29.535	0.099
27	Alloaromadendrene	31.03	0.21	31.038	0.071
28	β-Chamigrene	32.01	0.53	32.005	0.131
29	β-Eudesmene	32.07	0.30	32.071	0.259
30	5β, 10α-EUDESMA-4(14),11-DIENE	32.35	0.31	32.348	0.078
31	α-Selinene	32.43	0.13	32.433	0.088
32	Gamma-Cadinene	32.51	0.18	32.497	0.086
33	β-Elemene	32.82	0.07	32.822	0.038
34	(+)-Epi-bicyclosesauiphellanddrene	33.09	0.06	ND	ND
35	(-)-α-Panasinsen	33.31	0.06	33.311	0.024
36	Calamenene	33.56	0.09	33.565	0.024
37	(-)-Spathulenol	35.70	0.08	35.703	0.123
38	Caryophyllene oxide	35.85	0.05	35.856	0.056
39	2-Allyl-1,4-dimethoxy-3-methyl-benzene	36.41	0.23	36.421	0.034
40	Isoaromadendrene epoxide	38.29	0.06	38.291	0.084
41	Globulol	38.75	0.30	38.616	0.592
42	β-Tumerone	39.00	0.99	38.994	0.072

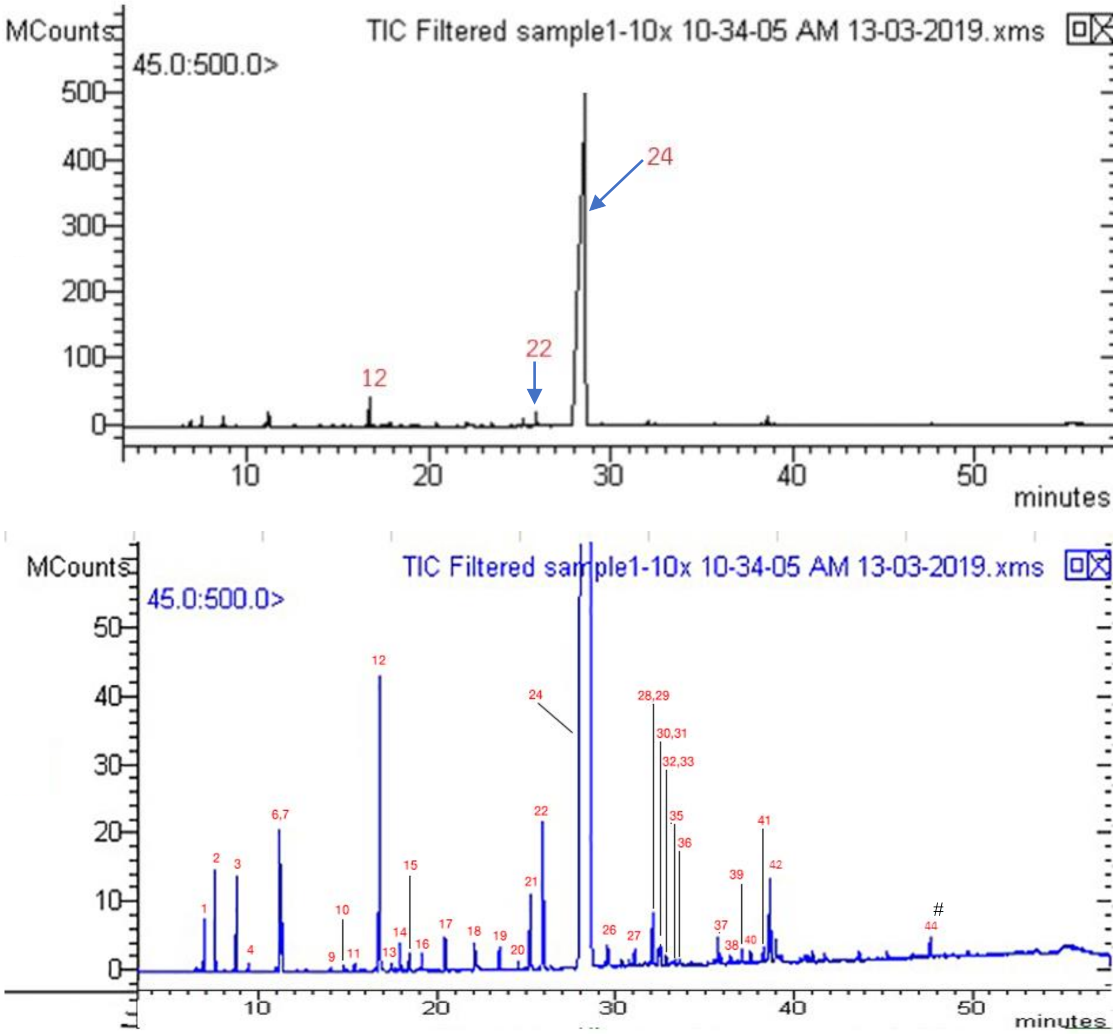
ลำดับ	Peak Name	ใต้ดิน		ทั้งต้น	
		RT (min)	%Area	RT (min)	%Area
43	α-Cedrene epoxide	41.70	0.14	ND	ND
44	Farnesyl acetone	ND	ND	47.650	0.092
45	1,3-Distearin	52.72	2.77	ND	ND

*ND: not detectable



หมายเลขแสดงในภาพ chromatogram คือลำดับในตารางที่ 8, เครื่องหมาย * พบเฉพาะในส่วนทั้งต้น

ภาพประกอบ 5 A คือ GC-MS Chromatogram ของน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน B คือ ส่วนขยายของ GC-MS Chromatogram ของน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน



หมายเลขแสดงในภาพ chromatogram คือลำดับในตารางที่ 8, เครื่องหมาย # พบเฉพาะในส่วนทั้งต้น

ภาพประกอบ 6 A คือ GC-MS Chromatogram ของน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น B คือ ภาพส่วนขยายของ GC-MS Chromatogram ของน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงด้วยเทคนิค GC-MS พบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนทั้งต้นจำนวน 44 ชนิดและส่วนใต้ดินจำนวน 37 ชนิด ดังแสดงในตาราง 8 โดยสารที่พบเป็นสัดส่วนสูงที่สุดทั้งส่วนทั้งต้นและส่วนใต้ดิน คือ 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene รองลงมาส่วนทั้งต้นคือ camphor และส่วนใต้ดินคือ 1,3-distearin โดย camphor พบมากเป็นอันดับสามในส่วนใต้ดิน มีสารที่พบเฉพาะส่วนทั้งต้นคือ farnesyl acetone และสารที่พบเฉพาะน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินได้แก่ m-cymene, γ-terpinene, p-

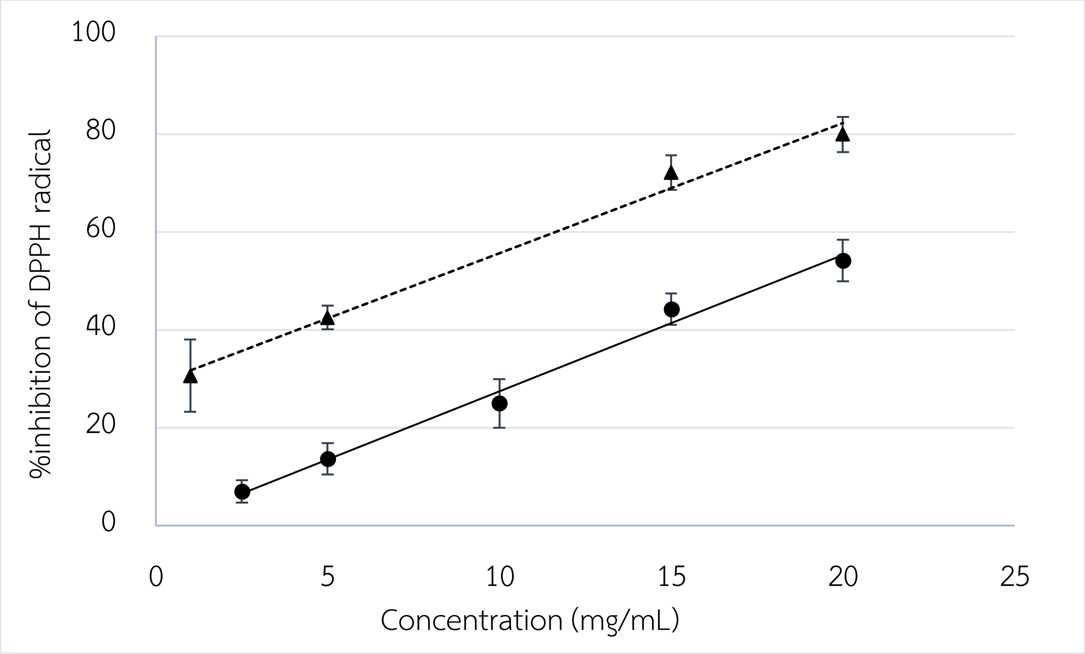
acesaldehyde, α-terpineol acetate, caryophyllene, (+) -epi-bicyclosesauiphellanddrene, α-cedrene epoxide, และ 1,3-distearin

4.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

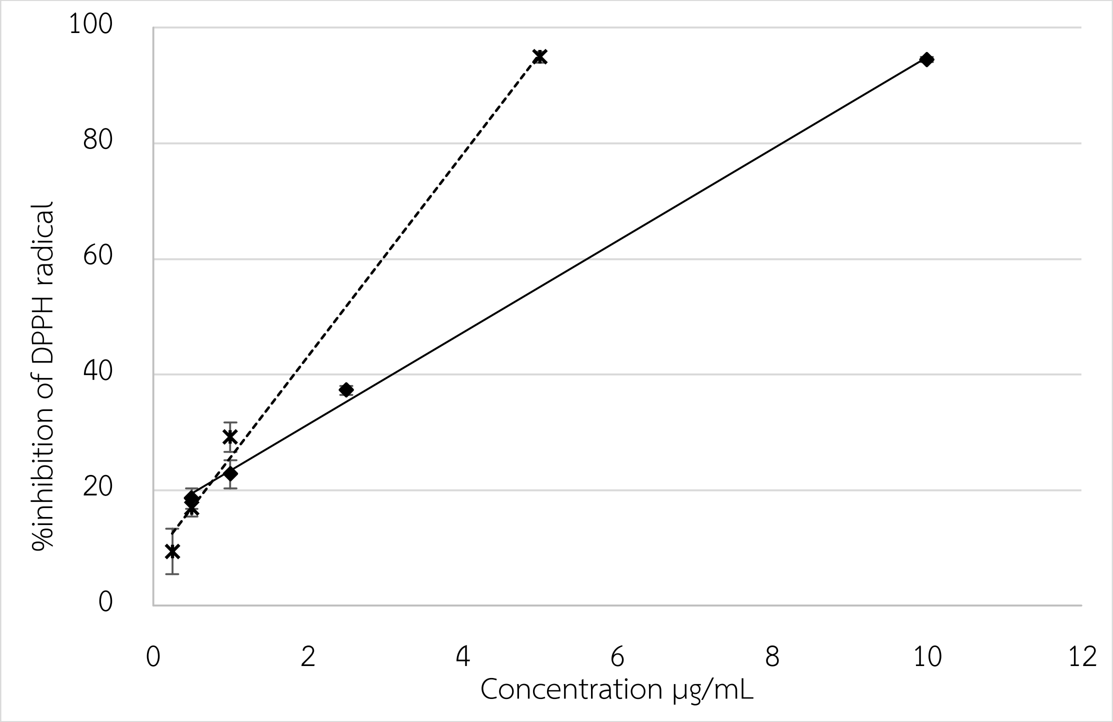
4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH โดยการเปรียบเทียบน้ำมันหอมระเหยของต้นว่านสาวหลงจากส่วนใต้ดิน และส่วนทั้งต้น ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ออกซิเดชันกับสารมาตรฐานคือ α-tocopherol และ ascorbic acid ในการทดสอบครั้งนี้ใช้ปริมาณความเข้มข้นของของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (50% inhibition concentration, IC_{50}) เป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงกับ % radical scavenging ดังแสดงในภาพประกอบ 7 – 8 เพื่อหาค่า IC_{50} ผลการทดสอบพบว่า น้ำมันหอมระเหยที่ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด (ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด) คือ น้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น ตามด้วยน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.96±1.63 และ 17.71±0.87 mg/ml ตามลำดับ โดยค่าต้านออกซิเดชันของสารมาตรฐาน α-tocopherol และ ascorbic acid มีค่าเท่ากับ 4.34±0.07 μg/mL และ 2.40±0.07 μg/mL ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ ดังแสดงในตาราง 9



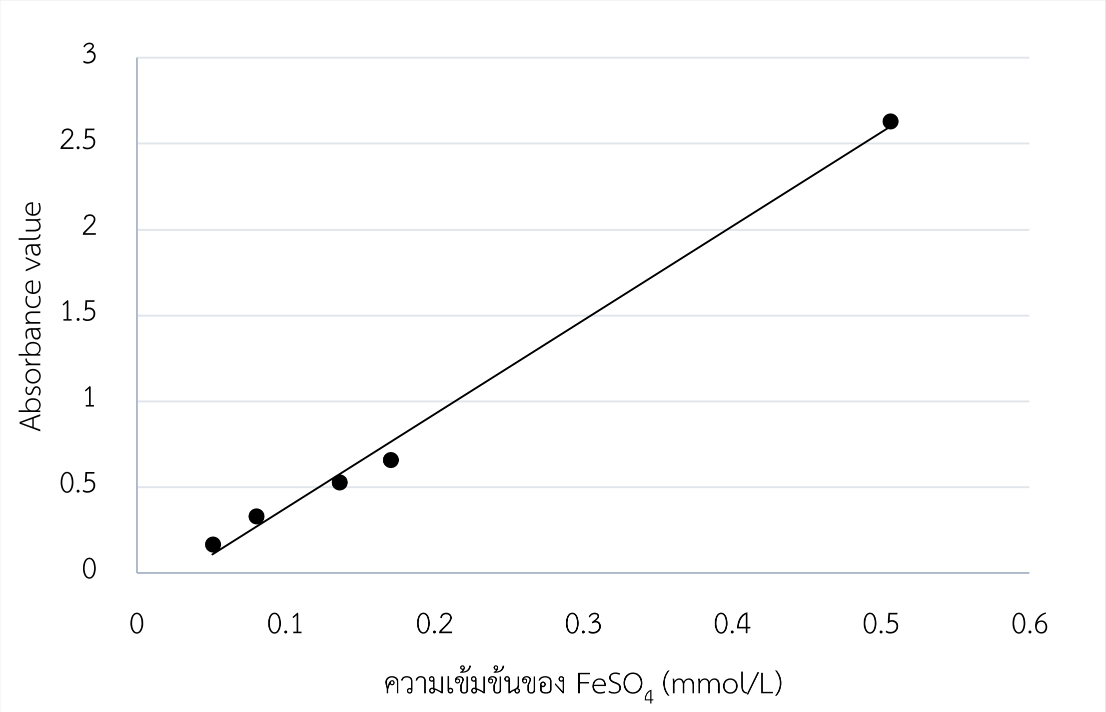
ภาพประกอบ 7 % inhibition of DPPH radical ที่ความเข้มข้นต่างๆของน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน (●) และส่วนทั้งต้น (▲) (n = 3)



ภาพประกอบ 8 % inhibition of DPPH radical ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน (Ascorbic acid (✕) และ α-tocopherol (◆) (n = 3)

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP โดยการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนใต้ดิน และส่วนทั้งต้น ทำการเปรียบเทียบกับสารต้านมาตรฐาน คือ ascorbic acid และ α-tocopherol ซึ่งการเปรียบเทียบในครั้งนี้ใช้ปริมาณความเข้มข้นของ $FeSO_4$ ดังแสดงในภาพที่ 9 เป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยรายงานค่าเป็นไมโครโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสไอออนต่อกรัมของสาร ผลการทดสอบพบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดินมีค่า FRAP value ที่ต่ำกว่าสารมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P value<0.05 โดยค่า FRAP value ของสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่าเท่ากับ 33.54±3.43 mM Fe^{2+} equivalents/g ของสาร และ α-tocopherol มีค่าเท่ากับ 10.93±1.67 mM Fe^{2+} equivalents/g ของสาร ดังแสดงในตาราง 9 ทั้งนี้ค่า FRAP value ของน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นและส่วนใต้ดินไม่แตกต่างกันที่ P value>0.05



ภาพประกอบ 9 กราฟมาตรฐานสารละลาย $FeSO_4$ (n = 3)

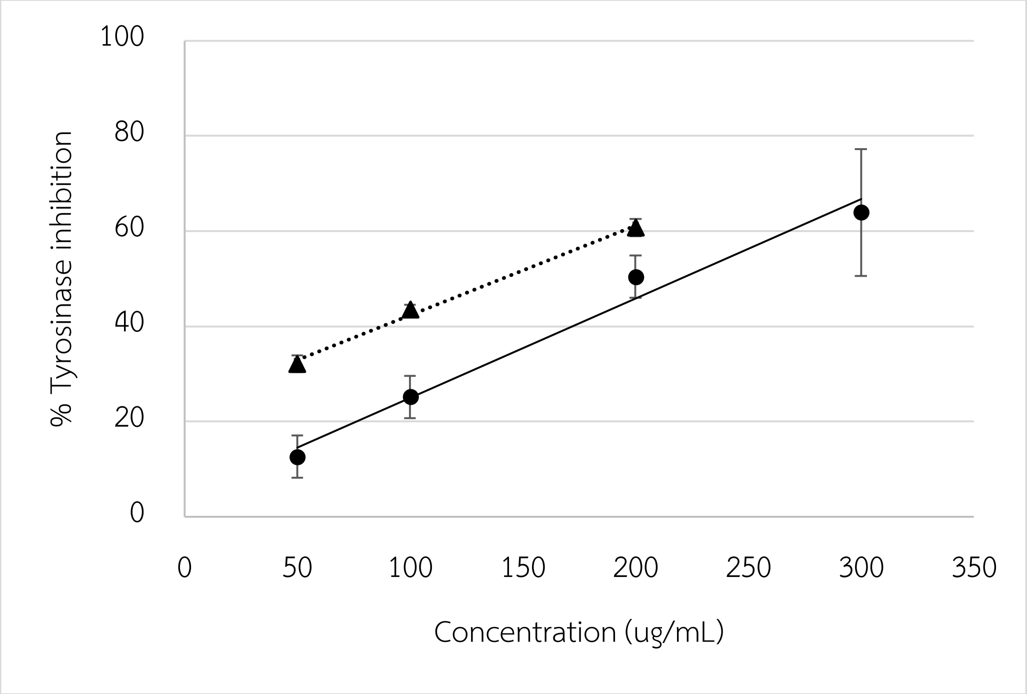
ตาราง 9 ความสามารถในต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

สารทดสอบ	IC_{50} ของวิธี DPPH	mM Fe^{2+} equivalents/g ของสารด้วยวิธี FRAP
น้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน	17.71±0.87 mg/ml$^{*,\#,¥}$	0.48 ±0.09$^{*,\#}$
น้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น	7.96±1.63 mg/ml$^{*,\#}$	0.59 ±0.10$^{*,\#}$
α-tocopherol	4.34±0.07 μg/mL	10.93 ±1.67
ascorbic acid	2.40±0.07μg/mL	33.54 ±3.43

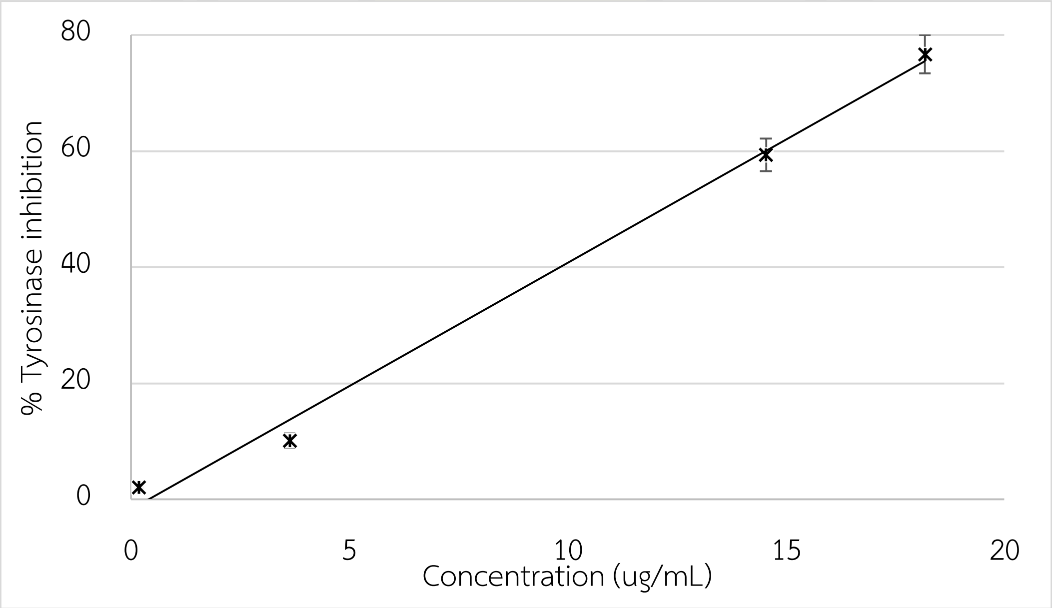
*: P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ α-tocopherol, #: P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ ascorbic acid, ¥: P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น

4.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีการ dopachrome method

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี dopachrome method เป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจะเปลี่ยนสารตั้งต้นคือ L-DOPA ไปเป็น pheomelanin และ eumelanin โดยการทดสอบจะเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงส่วนใต้ดิน และส่วนทั้งต้น ทำการเปรียบเทียบกับสารต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยมาตรฐาน คือ kojic acid ในการทดสอบในครั้งนี้ใช้ปริมาณความเข้มข้นของของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (50% inhibition concentration, IC_{50}) เป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยนำ ค่า % tyrosinase inhibition ไปสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร กับ % tyrosinase inhibition เพื่อหาค่า IC_{50} ดังแสดงในภาพประกอบ 10-11 ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงส่วนที่ให้ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด (ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด) คือ น้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน ตามด้วยน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 117.94±19.08 และ 147.03±10.28 μg /ml ตามลำดับ โดยฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐาน kojic acid มีค่าเท่ากับ 11.36 ± 0.22 μg/mLเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีการ dopachrome method ของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงตาราง 10



ภาพประกอบ 10% tyrosinase inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน (●) และส่วนทั้งต้น (▲) (n = 3) (n=3)



ภาพประกอบ 11 % tyrosinase inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของ Kojic acid (n=3)

ตาราง 10 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

สารทดสอบ	ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC_{50})
น้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน	117.94±19.08 µg/mL*
น้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น	147.03±10.28 µg/ml*
Kojic acid	11.36±0.22 µg/mL

*P value<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ Kojic acid

4.3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes*

4.3.4.1) การทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion method

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion Method เป็นการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้นเปรียบเทียบกับยาต้านเชื้อ *C. acnes* มาตรฐานคือ tetracycline รายงานผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ผลการทดสอบฤทธิ์ฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นที่ความเข้มข้น 1.5 mg/disc วัดค่า inhibition zone ได้ 9.18±0.17 mm และน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินที่ความเข้มข้น 1.5 mg/disc ค่า inhibition zone เท่ากับ 9.07±0.15 mm ซึ่งทั้งสองส่วนไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ P-value>0.05 แต่ทั้งสองส่วนแสดงค่า inhibition zone ต่ำกว่ายามาตรฐาน tetracycline ที่ความเข้มข้น 15 µg/mL ซึ่งเท่ากับ 55.33±1.53 mm ที่ P-value<0.05

4.3.4.2) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution method

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงโดยวิธี Broth dilution method แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ คือ *C. acnes* โดยการทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 µg/mL พบว่าค่าความเข้มข้น 50 µg/mL ลักษณะของอาหารเพาะเชื้อเริ่มขุ่นบริเวณก้นหลอดทดลอง แต่สารละลายส่วนใหญ่ใส และความเข้มข้น 100 µg/mL จนถึงความเข้มข้น 200 µg/mL อาหารเพราะเชื้อใส ดังแสดงในตาราง 11 ดังนั้นจึงทำการทดสอบเพิ่มเติมที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 150 µg/mL พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) เท่ากับ 75 µg/mL อาหารเพาะเชื้อเป็นสารละลายใส และเมื่อนำไป

ทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *C. acnes* (MBC) ที่ความเข้มข้น 300, 150, และ 75 µg/mL พบว่าค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *C. acnes* (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนใต้ดินและส่วนเหนือดิน เท่ากับ 75 µg/mL ดังแสดงในตาราง 11 12 และ 13

ตาราง 11 แสดงค่า inhibition zone ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC)

สารทดสอบ	%inhibition zone (mm)	ความเข้มข้นของสาร (µg/mL)	
		MIC	MBC
ส่วนใต้ดิน	9.07±0.15	75	75
ส่วนทั้งต้น	9.18±0.17	75	75
tetracycline	55.33±1.53	0.78	0.78

ตาราง 12 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 µg/mL

สารทดสอบ	**การทดสอบ**	**ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (µg/mL)**								
		200	100	50	25	12.5	6.25	P	N	V
ส่วนใต้ดิน	MIC	-	-	+	++	+++	+++	-	+++	+++
ส่วนทั้งต้น		-	-	+	++	+++	+++	-	+++	+++
ส่วนใต้ดิน	MBC	-	-	++	NA	NA	NA	-	+++	+++
ส่วนทั้งต้น		-	-	++	NA	NA	NA	-	+++	+++

N ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อที่ใช้ทดสอบ, P คือ positive control (tetracycline ความเข้มข้น 0.78 µg/mL), และ V คือ ตัวทำละลายและเชื้อที่ใช้ทดสอบ (+ คือ พบเชื้อน้อย, ++ คือ พบเชื้อปานกลาง, +++ คือ พบเชื้อมาก, - คือ ไม่พบเชื้อ และ NA คือ not application)

ตาราง 13 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 300 µg/mL

สารทดสอบ	**การทดสอบ**	**ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (µg/mL)**								
		300	150	75	37.5	18.25	9.125	P	N	V
ส่วนใต้ดิน	MIC	-	-	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
ส่วนทั้งต้น	MIC	-	-	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
ส่วนใต้ดิน	MBC	-	-	-	NA	NA	NA	-	+++	+++
ส่วนทั้งต้น	MBC	-	-	-	NA	NA	NA	-	+++	+++

N ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อที่ใช้ทดสอบ, P คือ positive control (tetracycline ความเข้มข้น 0.78 µg/mL), และ V คือ ตัวทำละลายและเชื้อที่ใช้ทดสอบ (+ คือ พบเชื้อน้อย, ++ คือ พบเชื้อปานกลาง, +++ คือ พบเชื้อมาก, - คือ ไม่พบเชื้อ และ NA คือ not application)

4.4 การพัฒนาตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงเปรียบเทียบระหว่างน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH ดีกว่าส่วนใต้ดินอย่างมีนัยสำคัญ (P-value<0.05) การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของทั้งสองส่วนไม่แตกต่างกันทางสถิติ และทั้ง 2 ส่วนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* เหมือนกันที่ความเข้มข้น 75 µg/mL เมื่อพิจารณาจากฤทธิ์ทางชีวภาพร่วมกับปริมาณผลผลิตที่กลั่นได้ น้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นได้ปริมาณผลผลิตมากกว่าส่วนใต้ดิน ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันหอมระเหยจากส่วนทั้งต้นมาใช้ในการพัฒนาตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง การคำนวณความเข้มข้นของน้ำมันว่านสาวหลงในตำรับคำนวณจากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง คือฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50} = 147.03±10.28 µg/ml) และฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ที่ความเข้มข้น 75 µg/mL เมื่อต้องการเตรียมตำรับครีมว่านสาว 100 มิลลิลิตร ดังนั้นต้องใช้น้ำมันหอมระเหยมากกว่า 29.406 mg และ 7.5 mg กรณีคำนวณตามผลการวิจัยของฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละที่ควรใช้ในตำรับครีมมากกว่า 0.029 และ 0.0075% ตามลำดับ แต่เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง ปริมาณที่ใช้เพื่อให้ได้ผลในการศึกษา clinical trials อาจต้องใช้ปริมาณที่สูงขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ความเข้มของน้ำมันหอมระเหยที่ 1% ของตำรับสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบและการศึกษาความคงตัว

4.4.1. การพัฒนาตำรับครีมว่านสาวหลง

จากการพัฒนาตำรับครีมว่านสาวหลง เมื่อเตรียมตำรับเสร็จใหม่ๆ พบว่าทั้ง 3 ตำรับมีลักษณะทางกายภาพที่ดี โดยแต่ละตำรับมีส่วนประกอบต่างกัน ดังแสดงในตาราง 14

ตาราง 14 ส่วนประกอบของตำรับที่ 1-3

ส่วนประกอบ	**สัดส่วนในตำรับ (ร้อยละ)**		
	ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2	ตำรับที่ 3
Cetyl alcohol	2.00	2.00	3.00
Mineral oil	4.00	5.00	2.00
Hard paraffin	2.00	3.00	3.00
Sorbitan oleate	1.00	1.00	1.00
Polysorbate 80	1.50	2.00	2.50
Triethanolamine	1.00	0.50	0.25
Isopropyl myristate	2.00	2.00	2.00
Carbopol 934	-	0.30	0.40
Carbopol 940	0.20	-	-
Propylene glycol	5.00	6.00	7.00
Methyl paraben	0.20	0.20	0.20
Propyl paraben	0.04	0.04	0.04
น้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง	1.00	1.00	1.00
Deionized water	80.06	76.96	77.61

การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตำรับหลังจากเตรียมตำรับเสร็จและหลังผ่านการทดสอบความคงตัวโดยวิธี Heating-Cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ ค่า pH และ ความ

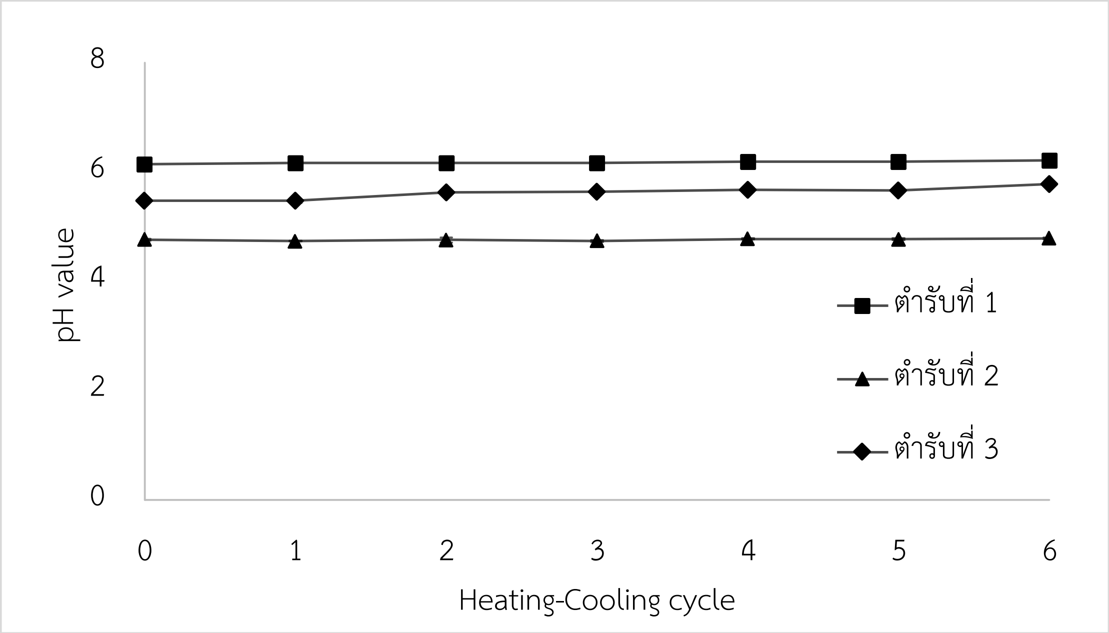
พหุปัญญาทิโต ชีเว

หนืดของตำรับที่ 1-3 วัดหลังเตรียมตำรับเสร็จ และหลังผ่าน Heating-Cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ แสดงในตาราง 14 จากการทดสอบสถิติพบว่าค่า pH และ ความหนืดของทั้งสามตำรับหลังผ่าน Heating-Cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ ไม่แตกต่างจากเมื่อเตรียมตำรับเสร็จใหม่ๆ ที่ P-value>0.05 ทั้งนี้ค่า pH ของตำรับที่ 1 มีค่ามากกว่าตำรับที่ 3 และ 2 ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 15 และภาพประกอบ 12 และค่าความหนืดของตำรับที่ 1 สูงกว่าตำรับที่ 3 และ 2 ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 15 และภาพประกอบ 13 ลักษณะทางกายภาพของตำรับหลังเตรียมตำรับเสร็จ และหลังผ่านการทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Heating-Cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ แสดงในตาราง 16 พบว่าตำรับที่ 1 และ 3 มีความคงตัวทางกายภาพดี แต่ตำรับที่ 2 มีลักษณะเนื้อครีมค่อนข้างเหลว หลังผ่านการทดสอบความคงตัวทั้งหมด 6 รอบ ดังแสดงในภาพประกอบ 14

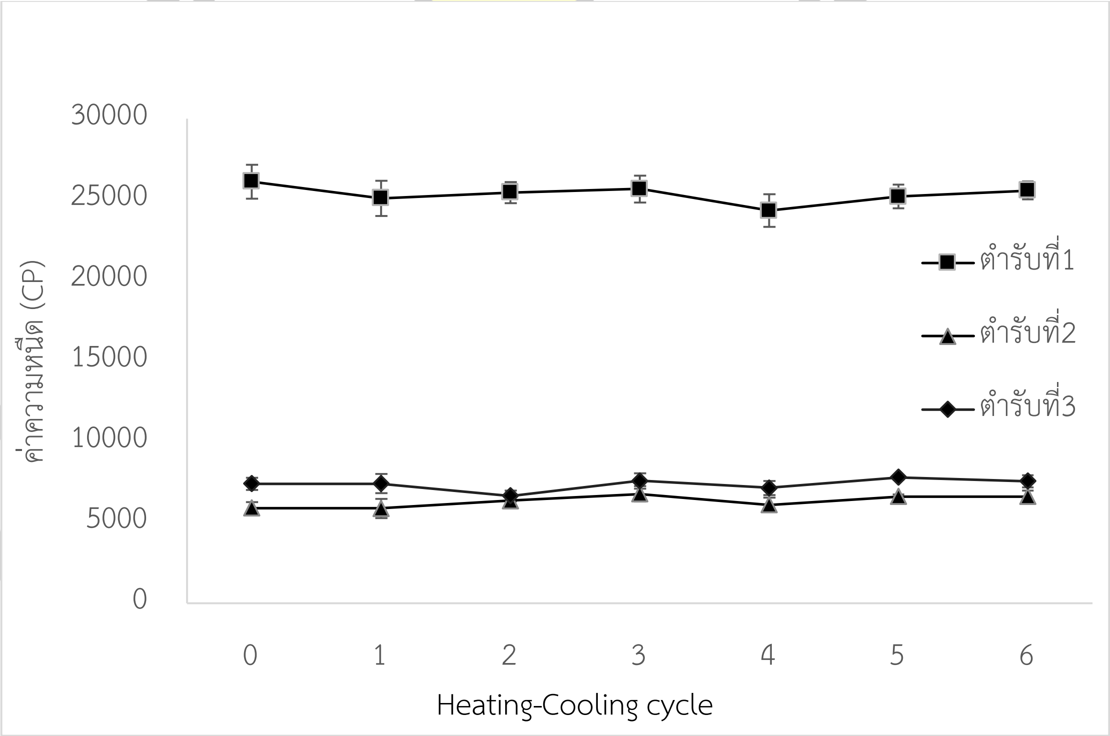
ตาราง 15 แสดงค่า pH และ ความหนืดของตำรับที่ 1-3 หลังจากเตรียมเสร็จใหม่ และหลังการทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Heating-Cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ

ค่าที่ชี้วัด	**หลังเตรียมเสร็จใหม่**	Heating-Cooling cycle					
		1	2	3	4	5	6
ตำรับที่ 1 pH	6.15±0.01	6.17±0.02	6.17±0.02	6.17±0.01	6.19±0.01	6.20±0.01	6.22±0.02
ตำรับที่ 1 ความหนืด (cp)	26,120.00 ±1044.68	25,083 ±1084.74	25,435.00 ±658.26	25,663.33 ±830.64	24,310.33 ±1005.50	25,189.67 ±743.44	25,568.00 ±548.71
ตำรับที่ 2 pH	4.76±0.01	4.74±0.04	4.76±0.02	4.74±0.01	4.78±0.03	4.77±0.02	4.79±0.02
ตำรับที่ 2 ความหนืด (cp)	5,880.00 ±513.68	5,874.00 ±869.91	6,336.33 ±769.97	6,755.33 ±863.96	6,085.33 ±517.67	6,607.00 ±1169.60	6,593.33 ±791.10
ตำรับที่ 3 pH	5.48±0.02	5.47±0.01	5.63±0.05	5.64±0.02	5.67±0.01	5.66±0.02	5.79±0.02
ตำรับที่ 3 ความหนืด (cp)	7,394 ±367.98	7,389 ±597.65	6635.00 ±336.14	7,566.33 ±480.11	7,129.33 ±432.04	7,788.33 ±136.12	7,560.00 ±374.98

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงค่า pH ของตำรับที่ 1, 2 และ 3 ที่ทดสอบความคงตัวด้วย Heating-Cooling Cycle (n=3)



ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงค่าความหนืด ของตำรับที่ 1, 2 และ 3 ที่ทดสอบความคงตัวด้วย Heating-Cooling Cycle (n=3)

ตาราง 16 ตารางแสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับหลังเตรียมเสร็จใหม่ (n=3)

ลักษณะของตำรับ	ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2	ตำรับที่ 3
สี	ขาว	ขาว	ขาว
กลิ่น	กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงชัดเจน	กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงชัดเจน	กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงชัดเจน
ความเนียน	เนื้อครีมเนียนละเอียด	เนื้อครีมเนียนละเอียด	เนื้อครีมเนียนละเอียด
ลักษณะของเนื้อครีม	ไม่เหลว เมื่อหยดบนผิว	เนื้อครีมค่อนข้างเหลว หยดบนผิวแล้วเนื้อครีมไหลได้	ไม่เหลว เมื่อหยดครีมบนผิว เนื้อครีมไหลบนผิวได้อย่างช้าๆ
การซึมผ่านผิวหนัง	ทาผิวแล้วยังคงความชื้น ไม่เหนียวเหนอะหนะ	แห้งเร็ว ซึมเข้าผิวเร็ว ไม่เหนียวเหนอะหนะ	แห้งเร็ว ซึมเข้าผิวเร็ว
การแยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น

ตาราง 17 ตารางแสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับหลัง Heating-Cooling cycle รอบที่ 6

ลักษณะของตำรับ	ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2	ตำรับที่ 3
สี	ขาว	ขาว	ขาว
กลิ่น	กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงชัดเจน	กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงชัดเจน	กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงชัดเจน
ความเนียน	เนื้อครีมเนียนละเอียด	เนื้อครีมเนียนละเอียด	เนื้อครีมเนียนละเอียด
ลักษณะของเนื้อครีม	ไม่เหลว เมื่อหยดบนผิว เนื้อครีมไม่ไหล	เนื้อครีมค่อนข้างเหลว หยดบนผิวแล้วเนื้อครีมไหลได้	ไม่เหลว เมื่อหยดครีมบนผิว เนื้อครีมไหลบนผิวอย่างช้าๆ

ลักษณะของตำรับ	ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2	ตำรับที่ 3
การซึมผ่านผิวหนัง	ทาผิวแล้วยังคงความชื้น ไม่เหนียวเหนอะหนะ	แห้งเร็ว ซึมเข้าผิวเร็ว ไม่เหนียวเหนอะหนะ	แห้งเร็ว ซึมเข้าผิวเร็ว
การแยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น

ตำรับที่ 1 ตำรับที่ 2 ตำรับที่ 3

ภาพประกอบ 14 ลักษณะทางกายภาพของตำรับหลัง Heating-Cooling cycle รอบที่ 6

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ และการพัฒนาตำรับเวชสำอางว่านสาวหลง ผู้วิจัยได้นำเสนอการสรุปและอภิปรายผลการศึกษาดังนี้

5.1 สรุปผล

5.1.1 การกลั่นน้ำมันหอมระเหย

จากการนำว่านสาวหลงมาสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือส่วนใต้ดิน และส่วนทั้งต้น น้ำมันหอมระเหยของว่านสาวหลงจากส่วนใต้ดิน คิดเป็นร้อยละของผลผลิตที่ได้เท่ากับ 0.43 และน้ำมันหอมระเหยของว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้นคิดเป็นร้อยละของผลผลิตที่ได้ 0.64 โดยน้ำมันหอมระเหยจากทั้ง 2 ส่วนมีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน กลิ่นไม่มีการปลี่ยนแปลง ไม่กลิ่นหืนของน้ำมัน มีกลิ่นของว่านสาวหลงชัดเจน

5.1.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี

จากตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง ด้วยเครื่องมือ GC-MSเพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนใต้ดิน และส่วนทั้งต้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินพบสารทั้งหมด 44 กลุ่มสารและน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นพบทั้งหมด 37 กลุ่ม โดยสารที่พบเป็นสัดส่วนสูงที่สุดทั้งส่วนทั้งต้นและส่วนใต้ดิน คือ 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene รองลงมาส่วนทั้งต้นคือ camphor และส่วนใต้ดินคือ 1,3-distearin โดย camphor พบมากเป็นอันดับสามในส่วนใต้ดิน มีสารที่พบเฉพาะส่วนทั้งต้นคือ farnesyl acetone และสารที่พบเฉพาะน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินได้แก่ m-cymene, γ-terpinene, p-acesaldehyde, α-terpineol acetate, caryophyllene, (+) -epi-bicyclosesauiphellanddrene, α-cedrene epoxide, และ 1,3-distearin

5.1.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

5.1.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากส่วนทั้งต้นให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าส่วนใต้ดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value}<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ส่วนมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารมาตรฐาน α-tocopherol และ ascorbic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value}<0.05$)

5.1.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay พบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดินมีค่า FRAP value ที่ต่ำกว่าสารมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value<0.05) ทั้งนี้ค่า FRAP value ของน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดินไม่แตกต่างกัน

5.1.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีการ dopachrome method

การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทรซิเนส พบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินและน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นมีฤทธิ์ไม่แตกต่างกัน (P-value>0.05) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 117.94±19.08 และ 147.03±10.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยของทั้ง 2 ส่วนมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำกว่าสารมาตรฐาน kojic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value<0.05)

5.1.3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes*

1) การทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion method

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นที่ความเข้มข้น 1.5 mg/disc วัดค่า inhibition zone ได้ 9.18 ± 0.17 mm สามารถยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินที่ความเข้มข้น 1.5 mg/disc ซึ่งมีค่า inhibition zone เท่ากับ 9.07± 0.15 mm แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P-value>0.05) ทั้งนี้ฤทธิ์การยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองส่วนมีฤทธิ์น้อยกว่ายามาตรฐาน tetracycline ที่ความเข้มข้น 15 µg/disc ซึ่งมีค่า inhibition zone เท่ากับ 55.33 ± 1.53 mm และเมื่อได้นำน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากทั้ง 2 ส่วนไปทดสอบด้วยวิธี Broth dilution method เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) พบว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่น้ำมันหอมระเหยจากส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้นสามารถยับยั้งเชื้อ *C. acnes* คือ 75 µg/mL และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงทั้ง 2 ส่วนเท่ากับ 75 µg/mL

5.1.4 การพัฒนาตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงเปรียบเทียบระหว่างน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ดีกว่าส่วนใต้ดินอย่างมีนัยสำคัญ (P-value<0.05) น้ำมันหอมระเหยทั้งสองส่วนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ไม่แตกต่าง ดังนั้นเมื่อพิจารณาร่วมกับปริมาณผลผลิตที่กลั่นน้ำมันหอมระเหยได้ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นได้ปริมาณผลผลิตมากกว่าส่วนใต้ดิน ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันหอมระเหยจากส่วนทั้งต้นมาใช้ในการพัฒนาตำรับครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง

จากการพัฒนาตำรับครีมว่านสาวหลง 3 ตำรับมีลักษณะทางกายภาพที่ดี และเมื่อนำมาศึกษาความคงตัวโดยการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตำรับเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังผ่านการทดสอบความคงตัวโดยวิธี Heating-Cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ พบว่าตำรับที่ 1 และ 3 มีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมี โดยค่า pH และ ความหนืดก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกันโดย pH ของตำรับทั้ง 2 ยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือมี pH ใกล้เคียงกับผิวหนัง ซึ่งลดโอกาสที่จะก่อให้เกิดการแพ้ระคายเคืองต่อผิวหนัง ลักษณะทางกายภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่ตำรับที่ 2 ไม่คงตัวทางกายภาพ เนื้อครีมเหลวลง เมื่อหยดครีมลงบนผิวเนื้อครีมไหลได้

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง และฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับการพัฒนาเป็นเวชสำอาง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเกิดสิว โดยศึกษาเปรียบเทียบน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดิน ที่สกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ ผลการทดลองพบว่า ผลผลิตน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดิน คิดเป็นร้อยละ 0.64 และ 0.43 ตามลำดับ โดยน้ำมันหอมระเหยที่ได้กลิ่นไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีกลิ่นของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงแรงกว่ารูปแบบต้นสดและแบบผง ไม่มีกลิ่นหืนของน้ำมันหอมระเหย การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงด้วยเทคนิค GC-MS พบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนทั้งต้นจำนวน 44 ชนิดและส่วนใต้ดินจำนวน 37 ชนิด โดยสารที่พบเป็นสัดส่วนสูงที่สุดทั้งส่วนทั้งต้นและส่วนใต้ดิน คือ 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene รองลงมาส่วนทั้งต้นคือ camphor และส่วนใต้ดินคือ 1,3-distearin โดย camphor พบมากเป็นอันดับสามในส่วนใต้ดิน มีสารที่พบเฉพาะส่วนทั้งต้นคือ farnesyl acetone และสารที่พบเฉพาะน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินได้แก่ m-cymene, γ-terpinene, p-acesaldehyde, α-terpineol acetate, caryophyllene, (+)-epi-bicyclosesauiphelland drene, α-cedrene epoxide, และ 1,3-distearin การที่น้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินพบจำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีมากกว่าส่วนทั้งต้น อาจเนื่องมาจากส่วนทั้งต้นมีส่วนของพืชที่เป็นส่วนเหนือดินรวมกับส่วนใต้ดิน ทำให้ปริมาณสารสำคัญบางชนิดที่พบในส่วนใต้ดินต่อน้ำหนักพืชที่ใช้กลั่นน้ำมันหอมระเหยน้อยกว่าส่วนใต้ดินเพียงอย่างเดียว สารสำคัญจากส่วนทั้งต้นจึงอาจอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าความไวของการตรวจจับของเครื่องมือได้ จากงานวิจัยของ (สนั่น ศุภธีรสกุล และกชกร มุสิกพงษ์, 2557) ที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของว่านสาวหลงส่วนเหนือดิน (ใบและกาบใบ) และส่วนใต้ดิน (เหง้า) ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (water distillation) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบจำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินและส่วน

เหนือดิน 10 และ 11 ชนิดตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ 7 และ 5 ชนิด ตามลำดับ โดยสารที่พบสัดส่วนสูงที่สุดทั้งส่วนใต้ดินและส่วนเหนือดิน คือ camphor และการศึกษาของ (Singtothong et al., 2013) พบองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงส่วนทั้งต้น 55 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ 11 ชนิด โดยสารที่พบสัดส่วนสูงที่สุด คือ camphor จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากรายงานการศึกษาแต่ละงาน มีองค์ประกอบทางเคมีที่ทั้งเหมือนและแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง อาทิเช่น ตัวอย่างพืชที่มีความแตกต่างทั้งสถานที่ปลูก ช่วงเวลาเก็บเกี่ยว ปริมาณน้ำและปุ๋ยที่ใช้ ปริมาณเปอร์เซ็นของแสงที่มีผลต่อปริมาณของผลผลิต (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา และ ยุทธนา บรรจง, 2550) เครื่องมือวิเคราะห์ที่มีความแตกต่างกัน ทั้งสภาวะการทดลอง การตั้งค่าอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา Mass Spectral Libraries ที่เลือกใช้ แม้ว่าสารเคมีที่มีสัดส่วนสูงที่สุดของน้ำมันหอมระเหยในการศึกษาครั้งนี้ จะแตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้า แต่ก็พบว่ามีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักเหมือนกันคือ camphor ซึ่งมีรายงานการวิจัยว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่มี camphor เป็นองค์ประกอบหลัก มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพหลายชนิด ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการไอ และมีคุณสมบัติเพิ่มการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนังอีกด้วย (Chen, et al, 2013) การพบสาร 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene ในสัดส่วนสูงที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Charoensuk, 2013) ที่สามารถแยกสารดังกล่าวได้จากสารสกัดส่วนใบที่สกัดด้วยเมทานอล โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี แบบ anti-tyrosinase activity-guided isolation และสอดคล้องกับการศึกษาของ (Dung, *et al.*, 1992) ที่พบสาร 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบ ส่วนลำต้น และส่วนไหล โดยพบปริมาณ 91.2%, 94.7%, และ 90% ตามลำดับ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ซึ่งพบสารดังกล่าว 86.42-92.63% นอกจากนี้ในน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินพบสาร 1,3-distearin หรือ glyceryl 1,3-distearate มีสัดส่วนสูงเป็นอันดับสองรองจาก 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene ซึ่งสารดังกล่าวพบในไบโอดีเซลที่เป็นส่วนผสมระหว่าง castor oil และ soybean oil (Moura et al, 2015) แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ปริมาณและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง จะสามารถนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรว่านสาวหลงที่มีจำหน่ายในร้านขายเครื่องยาสมุนไพรได้

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากส่วนทั้งต้นและส่วนใต้ดินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ (IC_{50} > 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) เมื่อพิจารณาร่วมกับการศึกษาก่อนหน้าของกล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2553 ที่พบว่าเหง้าว่านสาวหลงที่หมักด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ มีค่า IC_{50} จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 1.33±0.06, 0.47±0.01 และ 0.79±0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะ

เห็นได้ว่าว่านสาวหลงทั้งในรูปแบบน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดเฮกเซน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ทีความมีขั้วต่ำ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ต่ำ ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงและส่วนสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ จึงอาจไม่เหมาะจะนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทรซิเนส พบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินและน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นมีฤทธิ์ไม่แตกต่างกัน (P-value>0.05) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 117.94±19.08 147.03±10.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่มีฤทธิ์ต่ำกว่า kojic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าที่ใช้สารสกัดเหง้าว่านสาวหลงด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ผลการทดลอง มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 240±0.05 ถึง 1,890±0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2553) แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสดีกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ อาจเนื่องมาจากในน้ำมันหอมระเหยในการศึกษาครั้งนี้ มีสาร 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene ในปริมาณสูง และมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าสารดังกล่าวเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.70 ± 0.64 mM (Charoensuk *et al.*, 2013) ดังนั้น การเลือกใช้ว่านสาวหลงในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยสำหรับการพัฒนาเวชสำอางเพื่อทำให้ผิวกระจ่างใสจึงมีความเหมาะสม

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดสิว ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากว่านสาวหลงแสดงผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* และมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ได้ดี ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี Agar diffusion method พบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนทั้งต้นสามารถยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ไม่แตกต่างจากน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดิน (P-value>0.05) โดยวัดค่า inhibition zone ที่ความเข้มข้น 1.5 mg/disc ได้ 9.18±0.17 และ 9.07±0.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์น้อยกว่ายามาตรฐาน tetracycline โดยค่าการยับยั้งการเจริญเติบโต ของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองส่วนมีค่า antimicrobial disc diffusion zone อยู่ในระดับ resistant เมื่อเทียบกับ zone diameter interpretive standards ของยา tetracycline ≤ 14 mm (Fouad, 2011) ซึ่งการที่ค่า inhibition zone ของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองส่วนมีค่าที่ค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมากจากการแพร่ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยบนอาหารเพาะเชื้อชนิดแข็งได้ไม่ดี ทำให้การยับยั้งเชื้อเกิดขึ้นได้น้อย ร่วมกับการที่น้ำมันหอมระเหยมีการเจือจางความเข้มข้นจึงทำให้แสดงค่าการฤทธิ์ยับยั้งเชื้อต่ำ จากการศึกษาที่ผ่านมาของฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี disc diffusion method ในพืชวงศ์เดียวกัน เช่น *Curcuma longa* L., *Alpia galangal* (L.), *Swatz Zingiber offinale* Roscoe (Luangnarumitchai, 2007) พบว่ามีค่า Inhibition Zone น้อยกว่า 14 mm

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี Broth microdilution assay พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้งสองส่วนสามารถยับยั้งการเจริญเติมโตและฆ่าเชื้อ *C. acnes* ได้ โดยความเข้มข้นต่ำที่สุดที่น้ำมันหอมระเหยจากส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้นสามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุด

ที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) *C. acnes* ได้ เท่ากับ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่เคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ของว่านสาวหลง แต่มีการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยของพืชอื่นๆ ในวงศ์ Zingiberacea ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* เช่น น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่า เหง้าไพล เหง้าขิง เหง้าขมิ้นชัน (Luangnarumitchai et al., 2007) น้ำมันหอมระเหยจากเหง้ามหาหงส์ (Wongkattiya et al., 2016) เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์ Zingiberacea สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ดี ปัจจุบันพบว่าการใช้ยาต้านแบคทีเรียชนิดทาเพียงอย่างเดียวในการรักษาสิว จะก่อให้เกิดการดื้อยาได้ (Dumont et al., 2010; Luk et al., 2013; Schafer et al., 2013) การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* จากน้ำมันหอมระเหยจากพืชเพื่อพัฒนาเป็นเวชสำอางในการรักษาสิวที่เกิดจากเชื้อ *C. acnes* จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาสิวแบบยาทาเฉพาะที่ได้

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจะเห็นได้ว่า น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ได้ดี และยังมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงในการเป็นเวชสำอางเพื่อความงาม ต้านสิวและเพิ่มความกระจ่างใสให้กับผิวได้ จากการศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบระหว่างน้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้นพบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ส่วนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ที่เท่ากันที่ความเข้มข้น 75 µg/mL และต้านเอนไซม์ไทรซิเนส ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH พบว่าส่วนทั้งต้นมีฤทธิ์ดีกว่าส่วนใต้ดินอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) รวมถึงปริมาณผลผลิตที่กลั่นน้ำมันหอมระเหยของส่วนทั้งต้นได้ปริมาณมากกว่าส่วนใต้ดิน ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันหอมระเหยจากส่วนทั้งต้นมาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบครีมน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง เพื่อใช้เป็นเวชสำอางต้นแบบเพื่อต้านสิวที่เกิดจาก *C. acnes* เพิ่มความกระจ่างใสให้กับผิว และจากการพัฒนาตำรับครีมว่านสาวหลง พบว่าผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นสูตรที่ 1 และ 3 ได้เนื้อครีมที่มีลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ มีความคงตัวทางกายภาพ ค่า pH และค่าความหนืดไม่เปลี่ยนแปลงหลังผ่านการทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Heating-Cooling cycle จำนวน 6 รอบ หากเปรียบเทียบค่า pH ของตำรับทั้ง 3 แล้ว จะพบว่าตำรับที่ 1 มีค่า pH สูงกว่าตำรับที่ 2 และ 3 อาจเนื่องมาจากตำรับที่ 1 มีสัดส่วน triethanolamine ในตำรับมากกว่าตำรับที่ 2 และ 3 นอกจากนี้ยังพบว่าตำรับที่ 1 มีค่าความหนืดสูงกว่าตำรับที่ 2 และ 3 อาจเนื่องมาจากตำรับที่ 1 ใช้สารเพิ่มความหนืด (thickening agent) ในตำรับ คือ Carbopol 940 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ให้ความหนืดสูงกว่า Carbopol 934 ที่ใช้ในตำรับ 2 และ 3 และพบว่าตำรับที่ 3 มีค่าความหนืดสูงกว่าตำรับที่ 2 อาจเกิดจากปริมาณสารเพิ่มความหนืด (thickening agent) ในตำรับที่ 3 มากกว่าตำรับที่ 2 นอกจากนี้ยังมีปริมาณ cetyl alcohol และ propylene glycol ที่มากกว่าตำรับที่ 2 ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้ส่งผลให้

เนื้อครีมมีความข้นหนืดมากขึ้นได้ นอกจากนี้ propylene glycol ซึ่งมี pH 6-8 อาจส่งผลให้ตำรับที่ 3 มีค่า pH ของตำรับสูงกว่าตำรับที่ 2

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงจากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดินพบว่าทั้งสองส่วนมีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในสัดส่วนสูงที่สุดเช่นเดียวกัน คือสาร 1-[(E)-but-1-enyl]-4-methoxybenzene การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงพบว่ามีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทรซิเนส และฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ที่เป็นสาเหตุการเกิดสิวได้ดี โดยน้ำมันหอมระเหยจากส่วนทั้งต้น และส่วนใต้ดินแสดงฤทธิ์ทั้งสองไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการนำมาใช้ประโยชน์ทางเวชสำอางจึงสามารถใช้ได้ทั้งส่วนทั้งต้นและส่วนใต้ดิน แต่หากพิจารณาในแง่ของร้อยละปริมาณผลผลิตที่กลั่นน้ำมันหอมระเหยได้ ส่วนทั้งต้นจะมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้มากกว่าส่วนใต้ดิน ซึ่งมีผลต่อการลดต้นทุนการผลิตเมื่อนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม จากความโดดเด่นในเรื่องของการมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง และประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทรซิเนส และต้านเชื้อ *C. acnes* ที่เป็นสาเหตุการเกิดสิว น้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลงนี้จึงเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นเวชสำอางสำหรับใช้ภายนอกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะการนำไปใช้สำหรับเพิ่มความกระจ่างใสให้กับผิว และต้านสิว

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรมีการศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากแหล่งที่แตกต่างกัน หรืออายุในการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน เพราะอาจเป็นปัจจัยของปริมาณน้ำมันหอมระเหยหรือฤทธิ์ทางชีวภาพได้

5.3.2 ควรศึกษาตัวอย่างว่านสาวหลงในรูปแบบสดเปรียบเทียบกับตัวอย่างผงแห้ง เนื่องจากตัวอย่างแห้งที่ผ่านการอบอาจมีการสูญเสียของน้ำมันหอมระเหย

5.3.3 การนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาจใช้แบบต้นสดดีกว่าแบบแห้ง เนื่องจากสมุนไพรแบบแห้งอาจมีการสูญเสียของน้ำมันหอมระเหย

5.3.4 วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยในขั้นอุตสาหกรรมอาจใช้วิธี Steam Distillation ซึ่งเป็นวิธีการสกัดโดยไอน้ำลอยขึ้นไปจะสกัดเอาน้ำมันเหย ซึ่งจะช่วยลดการสูญเสียน้ำมันหอมระเหยและลดการทำลายสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยไม่ได้สัมผัสความร้อนโดยตรง

5.3.5 ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพของครีมว่านสาวหลงที่พัฒนาได้ในอาสาสมัคร (clinical trials) และความปลอดภัยเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพปลอดภัย

5.3.6 ควรมีการศึกษาความคงตัวระยะยาวเพื่อหา shelf life ที่แท้จริงของครีมว่านสาวหลงที่พัฒนาขึ้น

พหุน ปณ ติ โต ชีว

บรรณานุกรม

กมลชนก อบอุ่น และปิลันธนา เลิศสถิตธนกร. (2554). การพัฒนาครีมนวดเท้าจากน้ำมันขิงเพื่อบรรเทาอาการชาและปวดที่เท้าในผู้ป่วยโรคเส้นประสาทจากเบาหวาน. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน, 7(1), 28–38.

กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. (2551). แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วย การพัฒนาสมุนไพรไทย. กระทรวงสาธารณสุข, บริษัท ทีเอส อินเตอร์พริ้นท์ จำกัด. 39(5), 561-563

กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย, 2(ฉบับพิเศษ), 143–150.

ขวัญจิต อิสระสุข. (2558). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบลองกอง. SDU Research Journal, 8(3), 81–96.

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. (2553). “ว่านสาวหลง” เสน่ห์พืชหอมล้านนา สู่งานวิจัยต้นแบบผลิตภัณฑ์. เปิดโลกเขียวมะกอก.
https://www.pharmacy.cmu. ac.th/web2553/n03.php

ชนินดา เพชรสังฆาต. (2558). การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ยา. วารสารเพื่อการวิ จัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรร, 22(3), 22–25.

ดวงกมล เลียวกิตติกุล, วิภาวี ชัยวิรัตนะ, มานิตา หาญพานิชเจริญ และฉันทนา อารมณ์ดี (2553). Formulation of cream containing extract from centella. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี), 4(2), 39–53.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2554). วิธีการสกัดสมุนไพร กระบวนการผลิตยาสมุนไพรด้วย ด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัย. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 155-160

นลิน วงศ์ขัตติยะ, ทวินันท์ หาญประเสร็ฐ, พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี, รุ่งทิพย์ กาวารี, Fraser I.H และดลฤดี สงวนเสริมศร (2559). ฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยมหาหงส์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของสิว. Naresuan University Journal: Science and Technology, 24(3), 25–31.

บุหรัน พันธ์สวรรค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 21(3), 275–286.

ประไพพิศ อินเสน. (2561). การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รีไทย. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 12(2), 69–82.

ประภัสสร วีระพันธ์ และวัชรี คุณกิตติ. (2554). คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยในหลอดทดลอง. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน, 7(3), 631–639.

ปวีณ์นุช ถือแก้ว. (2560). น้ำมันหอมระเหย. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. http://www.most.go.th/main/th/380-news/activity-news/7425-essential-oil

พงษ์ศักดิ์ พลเสนา. (2550). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อนฉบับสมบูรณ์. ปราจีนบุรี: ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณ์ภัณฑ์.

พงษ์ศักดิ์ พลเสนา และ ยุทธนา บรรจง. (2550). อิทธิพลของความเข้มแสงต่อผลผลิตว่านสาวหลง (*Amomum biflorum* Jack.). งานสวนพฤกษศาสตร์ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 609–615.

พัชรินทร์ บุญหล้า, เมธิน ผดุงกิจ, อุดมศักดิ์ มหาวีรวัฒน์ และธิดารัตน์ สมดี (2557). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดใบชะพลู. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน, 10(3), 283–294.

ณัฐวุฒิ ลีลากนก. (2561). การบริบาลทางเภสัชกรรมในผู้ป่วยสิว. บทความวิชาการสำหรับการศึกษาต่อเนื่อง (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา).

มูฮำหมัด นิยมเดชา และดวงพร โลหะวิทยานันท์ (2559). การสังเคราะห์อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์เพื่อใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (ทำให้ผิวขาว). Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University, 5(3), 66–81.

โลมไสล วงศ์จันตา และคณะ (2556). คู่คิดพิชิต GC-MS (Gas Chromatograph Mass Spectrometer). ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์, 1-17

วันวิสาข์ คุณะวัฒนกุล, วนิดา ไทรชมภู, คัทลียา เมฆจรัสกุล, อมรรัตน์ เจริญมิตร ชิดชนก เหล็กดี และณัฐภากานต์ ศรีจันทร์. (2560). ฤทธิ์ต้านเชื้อสิว (*Propionibacterium acnes*) จากสมุนไพรไทย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 36(5), 608–613.

สนั่น ศุภธีรสกุล และกชกร มุสิกพงษ์. (2557). ผลต่อการผ่อนคลายในอาสาสมัครของน้ำมันหอมระเหยจากว่านสาวหลง. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ, *17*(2), 17–25.

สิริลักษณ์ มายานิม. (2545). น้ำมันหอมระเหยสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย. *สมอสาร*, *28*(325), 1–6.

สุชาดา มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์, 15(1), 106–117.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. (2016). ฐานข้อมูลตัวอย่างพรรณไม้แห้ง, องค์การสวนพฤกษศาสตร์. http://www.qsbg.org

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. (2556). จุลชีววิทยาทางการแพทย์:แบคทีเรียก่อโรค. บริษัท จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์ จำกัด.

อรอุมา ภู่ประเสริฐ และมาลัย สถิรพันธุ์. (2549). Hyphenated Techniques of the Pharmaceutical Analytical Instruments. วารสารไทยไภษัชยนิพนธ์, 3, 1–23.

Charoensuk, Y. (2013). Isolation and biological activitire of *Amomum biflorum* Jack leaves, Master Thesis, Burapha University, Chonburi.

Chen, W., Vermaak, I., and Viljoen, A. (2013). Camphor-a fumigant during the black death and a coveted fragrant wood in ancient egypt and babylon-a review. Molecules, 18(5), 5434–5454.

Clarke, G., Ting, K. N., Wiart, C., and Fry, J. (2013). High correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian Rainforest. Antioxidants, 2 (1), 1–10.

Department of Medical Sciences. (2016). Thai Herbal Pharmacopoeia 2016. Department of Medical Sciences.

Dai, D.N., Huong L.T, Thang, T.D. and I. A. Ogunmande I.A. (2016). Chemical composition of essential oils of *Amomum villosum* Lour. American Journal of Essential Oils and Natural Products, 4(3), 8–11.

Dung, N.X., Phuong, D.L., and Leclercq, P.A., (1992). Trans-p-(1-buteny1) anisole: The main component in the leaf, stem and root oils of *Amomum schmidtti* Gagnep. from Vietnam. Journal of Essential Oil Research, 4, 239–242.

Dumont-Wallon, G., Moyse, D., Blouin, E., and Dreno, B. (2010). Bacterial resistance in French acne patient. Int. Dermato, *49*, 283–288.

Fouad, Z. (2011). Antimicrobial Disk Diffusion Zone Interpretation Guide. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13801.70240

European committee for standardization. (2013). Aromatic natural raw materials – Vocabulary International Organization for Standardization. EN ISO 9235:2013, 1-8

Luk, N.M., *et al* (2013). Antibiotic resistant *Propionibacterium acnes* among acnes patients in a reginal skin centre in Hong Kong. The European Academy of Dermatology and Venereology, 27, 31–36.

Matsuura, R., Ukeda, H., & Sawamura, M. (2006). Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(6), 2309–2313.

Minh Ai, N.X., Binh Phuong, D., Viet, H. (2009). Study of essential oil of *Amomum biflorum* (Jack). Proceedings of 3rd National Scientific Conference on Ecology and Biological Resources.

Moura, R.R., Dias, A.N., Freitas Granjão, V., Primel E.G., and Montes D'Oca, M.G. (2015). Determination of acylglycerols and glycerol in castor: soybean biodiesel blend produced by a base/acid-catalyzed process. American Oil Chemists' Society, 92, 1555–1565.

National Center for Biotechnology Information. (n.d.). PubChem Compound Database. Retrieved November 12, 2018, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442343

Norajit, K., Laohakunjit, N., and Kerdchoechuen, O. (2007). Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. Molecules (Basel, Switzerland), *12*(8), 2047–2060.

Luangnarumitchai, S., Lamlertthon, S.and Tiyaboonchai, W. (2007). Antimicrobial activity of essential oils against five strains of *Propionibacterium acnes*. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences, 34(4), 60–64.

Schafer, F., Fich, F., Lam, M., Garate, C., Wozniak, A., and Garcia, P. (2013). Antimicrobail susceptibility and genetic characteristics of Propionibacterium acnes isolated from patients with acne. International Journal of Dermatology, 52, 418–425.

Singtothong, C., Gagnon, M. J., & Legault, J. (2013). Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Amomum biflorum* Jack. Natural Product Communications, 8(2), 265–267.

The Plant List. (2013). The Plant List. On the Internet. http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-219191

ภาคผนวก

1. การเตรียมสาร

1.1 การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM (MW เท่ากับ 394.2 g/mol) ชั่ง 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) 0.0078864 กรัม ละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 99.9 ปรับปริมาตรให้เป็น 200

1.2 การเตรียม FRAP reagent

1.2.1 การเตรียม 300 mM Acetate Buffer pH 3.6

- ชั่ง Sodium acetate จำนวน 3.6 g และเติม glacial acetic acid 16 ml แล้วเติมน้ำกลั่น ให้ครบ 1,000 ml ปรับ pH ให้ได้ 3.6

1.2.2 เตรียม 40 mM HCl

- โดยปิเปต 6MHCl จำนวน 3.33 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml

1.2.3 เตรียม 10 mM TPTZ

- โดยชั่ง TPTZ จำนวน 0.031 กรัม แล้วเติม 40 mM HCl ให้ครบ 10 mL

1.2.4 เตรียม 20 M เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ปริมาตร 10 mL

- โดยชั่ง $FeCl_3$ 0.0540 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน

นำสารละลาย 300 mM acetate Buffer pH 3.6 สารละลาย 10 mM TPTZ และ 20 M เฟอร์ริกลอไรด์ ($FeCl_3$) มาผสมด้วยอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ จะได้ FRAP reagent

1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟส ($FeSO_4$)

- โดยการชั่งเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.0280 กรัม ทำการละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร (stock 1,000 ไมโครโมลต่อลิตร)

1.4 การเตรียม PBS pH 6.8

1.4.1 สารละลาย-A (0.2 M $Na_2HPO_4.2H_2O$)

- ชั่งสาร $Na_2HPO_4.2H_2O$ จำนวน 35.6 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

1.4.2 สารละลาย-B (0.2 M, $NaH_2PO_4.2H_2O$)

- ชั่งสาร $NaH_2PO_4.2H_2O$ จำนวน 31.2 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

1.4.3 นำสารละลาย B ปริมาตร 51 mL ผสมกับสารละลาย A ปริมาตร 49 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 200 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน

พหุน ปณฺ ศฺ โต ชีเว

1.5 การเตรียมสารละลาย mushroom tyrosinase enzyme (31 Units/mL)

ละลายใน PBS pH 6.8

1.6 Preparation of L-DOPA solution (2.55 mM) M.W. = 197.19

ชั่งสาร L-DOPA 0.0123 กรัม ละลายด้วย phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 25 mL

2. การทดสอบฤทธิ์เชื้อ *C. acnes*

ตาราง 18 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) tetracycline

สารทดสอบ	การทดสอบ	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน tetracycline (µg/mL)								
		25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	N	V
tetracycline	MIC	-	-	-	-	-	-	++	ขุ่น	ขุ่น
	MBC	NA	NA	NA	NA	-	-	++	มีเชื้อ	มีเชื้อ

N ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อที่ใช้ทดสอบ และ V คือ ตัวทำละลายและเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เชื้อที่ใช้ทดสอบ (+ คือ พบเชื้อน้อย, ++ คือ พบเชื้อปานกลาง, +++ คือ พบเชื้อมาก, - คือ ไม่พบเชื้อ และ NA คือ not application)

พหูน ปณฺ ฑิโต ชีเว

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายอรรถพล อุทัยเรือง
วันเกิด	วันที่ 3 มกราคม พ.ศ. 2534
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 36 หมู่ 4 ตำบลดอนหว่าน อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม รหัสไปรษณีย์ 44000
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	ผู้ช่วยผู้จัดโรงงานฟาร์มแคร์ฟาร์มาซูติคอล
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงงานผลิตยาแผนโบราณฟาร์มแคร์ฟาร์มาซูติคอล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม รหัสไปรษณีย์ 44150
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2557 ปริญญาแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต (พทป.บ.) สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง พ.ศ. 2563 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม